



38

**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/88, A61K 31/70, 47/48</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 97/30170</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	21. August 1997 (21.08.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP97/00649</b>		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 13. Februar 1997 (13.02.97)			
(30) Prioritätsdaten: 196 05 548.2      15. Februar 1996 (15.02.96)      DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WAGNER, Ernst [AT/AT]; Wiener Strasse 201, A-2103 Langenzersdorf (AT). MECHTLER, Karl [AT/AT]; Kirchenzeile 22, A-2126 Ladendorf (AT). KICHLER, Antoine [FR/FR]; 13, rue Grison, F-45000 Orléans (FR).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER INGELHEIM IN- TERNATIONAL GMBH; Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE).			

(54) Title: COMPOSITION FOR THE TRANSFECTION OF HIGHER EUKARYOTIC CELLS

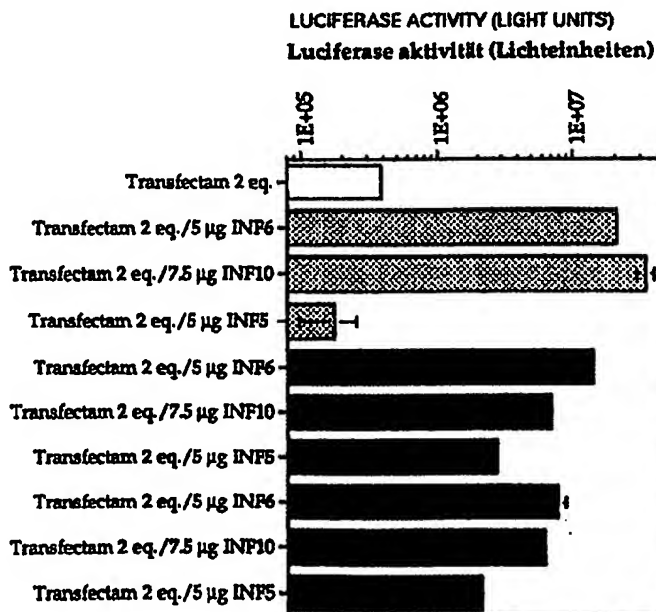
(54) Bezeichnung: ZUSAMMENSETZUNG FÜR DIE TRANSFEKTION HÖHERER EUKARYOTISCHER ZELLEN

(57) Abstract

The invention concerns a composition for the transfection of higher eucaryotic cells. A complex of a nucleic acid to be expressed in the cell and a cationic lipid present in a suboptimal concentration for transfection contains one or a plurality of membrane-active acid peptides and optionally helper lipid(s). The ratio of the total number of positive charges to the total number of negative charges in the composition is between approximately 0 and approximately 3.

(57) Zusammenfassung

Zusammensetzung für die Transfektion höherer eukaryotischer Zellen. Ein Komplex aus einer in der Zelle zu exprimierenden Nukleinsäure und einem kationischen Lipid, das in einer für die Transfektion suboptimalen Konzentration vorliegt, enthält ein oder mehrere membranaktive saure Peptide, sowie gegebenenfalls Helferlipid(e). Das Verhältnis der Gesamtzahl der positiven zur Gesamtzahl der negativen Ladungen in der Zusammensetzung beträgt ca. 0 bis ca. 3.



### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LX	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Zusammensetzung für die Transfektion höherer eukaryotischer Zellen

Die Erfindung bezieht sich auf die Transfektion von höheren eukaryotischen Zellen, insbesondere von Säugetierzellen.

Bedarf an einem effizienten System für das Einführen von Nukleinsäure in lebende Zellen besteht vor allem im Rahmen der Gentherapie. Dabei werden Gene in Zellen eingeschleust, um *in vivo* die Synthese therapeutisch wirksamer Genprodukte zu erzielen.

Die bisher am weitesten fortgeschrittenen und verbreiteten Technologien für die Anwendung von Nukleinsäuren im Rahmen der Gentherapie benutzten Systeme für den Transfer von Genen in die Zelle funktionieren auf der Grundlage von Viren, insbesondere Retroviren und Adenoviren (Miller, 1992; Mulligan, 1993; Berkner; 1988), und kationischen Lipiden (Behr, 1994). Alternative Strategien für den Gentransfer beruhen auf Mechanismen, deren sich die Zelle für den Transport von Makromolekülen bedient. Ein Beispiel dafür ist der Import von Genen in die Zelle über den Weg der Rezeptor-vermittelten Endozytose (z.B. Wu und Wu, 1987, Wagner et al., 1990, EP-A1 0388 758).

Von den im letzten Jahrzehnt entwickelten synthetischen Gentransfervehikeln haben sich mono- und polykationische amphipathische Lipide, die DNA komplexieren und kondensieren können, als besonders vielversprechend erwiesen (Behr, et al., 1989; Felgner, et al., 1987 und 1994; Leventis, et al., 1990; Gao, et al., 1991; Rose, et al., 1991; Hawley-Nelson, et al., 1993; Weibel, et al., 1995; Solodin, et al., 1995).

Bestrebungen zur Steigerung der Leistungsfähigkeit von Gentransfermethoden auf der Grundlage von kationischen Lipiden konzentrierten sich bisher auf die direkte Modifikation des kationischen Lipids, z.B. durch Acylgruppen, Spacer-Arme oder hydrophile Abschnitte (Remy, et al., 1994; Felgner, et al., 1994). Trotz verbesserter Ergebnisse aufgrund solcher Maßnahmen ist noch immer vieles über den Eintrittsmechanismus von Lipid/DNA-Partikeln in die Zelle unklar. Aufgrund jüngerer Veröffentlichungen (Zabner, et al., 1995) dürfte der Haupttransportweg dieser Partikel über die Endozytose verlaufen.

Kationische Lipide zeigen *in vitro* die besten Transfektionsergebnisse bei deutlichem positivem Ladungsüberschuß. So hat sich z.B. für das Lipospermin DOGS (Di-octadecylamidoglycylspermin, kommerziell erhältlich unter dem Handelsnamen "Transfectam") ein drei- bis sechsfacher Überschuß an positiven Ladungen im Verhältnis zur DNA als für die Transfektionseffizienz optimal erwiesen (Barthel, et al., 1993). Die positiven Ladungen fördern die Bindung des Komplexes und deren Aufnahme in die Zellen. Zusätzlich hat Transfectam eine Pufferwirkung auf die Endosomen (der pKa-Wert des am wenigsten basischen sekundären Amins von Lipospermin, das für die Pufferwirkung maßgeblich ist, beträgt ca. 5.4; Behr, 1994) und schützt daher einerseits die DNA vor enzymatischem Abbau, andererseits verursacht es ein osmotisches Anschwellen und eine anschließende Destabilisierung der gepufferten Endosomen. Eine stark positive Ladung der Lipid/DNA-Komplexe hat somit bei der Anwendung *in vivo* u.a. den Nachteil, daß die Lipid/DNA-Partikel nur eine sehr kurze Halbwertszeit haben.

Um die Effizienz der Lipopolyamine DOGS und DPPES (Palmitoylphosphatidylethanolamin) bei geringem positivem Ladungsüberschuß (Verhältnis positive:negative Ladungen  $\leq 2$ , vorzugsweise 0.5 bis 1.5) zu verbessern, wurde der Zusatz von Adjuvantien vorgeschlagen, die mit dem Lipopolyamin/Nukleinsäure-Komplex assoziieren können, z.B. der Zusatz sog. "Helferlipide".

Von Kamata, et al., 1994, wurde die Effizienz des Gentransfers, der mit Lipofectin, einem 1:1 Gemisch aus dem monokationischen Lipid DOTMA (N-[1-(2,3-Diolelyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid) und dem Helferlipid DOPE (Diolelylphosphatidylethanolamin), bei einem positiven Ladungsüberschuß von 1.25 erzielt wurde, mittels Peptiden um das 3 bis 5fache erhöht.

Ähnlich wurde in der WO 95/02698 vorgeschlagen, für die Transfektion von Zellen kationische Lipide in Kombination mit membranaktiven Peptiden von Viren mit Hülle, u.a. von Influenzaviren, einzusetzen, wobei eines der von Kamata et.al., 1994 beschriebenen Peptide oder ein vom Glycoprotein von Vesicular Stomatitis Virus abgeleitetes Peptid in Kombination mit Lipofectamin, einem 3:1 Gemisch des polykationischen Lipids 2,3-Diolelyloxy-N-[2(spermincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminiumtrifluoracetat (DOSPA) und DOPE verwendet und bei einem als optimal ermittelten positiven Ladungsüberschuß von ca. 20 eine Verbesserung der Transfektionseffizienz um das bis zu 12fache erzielt wurde.

Andererseits brachten kationische Lipide, die mit viralen Peptiden konjugiert wurden, um ihnen die fusogenen oder karyophilen Eigenschaften von Viren zu

verleihen, enttäuschende Ergebnisse bei optimaler Lipidkonzentration (Remy et al., 1995).

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, ein neues Gentransfersystem auf der Grundlage kationischer Lipide bereitzustellen.

Bei der Lösung der gestellten Aufgabe wurde zunächst die Frage gestellt, ob es die an die Endozytose anschließenden Schritte sind, wie der Transport von DNA aus dem Endosom ins Zytoplasma und weiter in den Kern, die den Engpaß für einen erfolgreichen Gentransfer mit kationischen Lipiden darstellen.

Es wurde festgestellt, daß der Zusatz von membranaktiven Influenzaeptiden nur eine geringfügige Verstärkung der Genexpression (1.5 bis 5fach) mit Transfectam bewirkt, wenn dieses bei optimalen Konzentrationen, also bei hohem positivem Ladungsüberschuß, eingesetzt wird. Dies läßt darauf schließen, daß in diesem Zusammenhang der Engpaß für den Gentransfer nicht die Freisetzung aus den endozytotischen Vesikeln sein dürfte, was auch im Einklang mit den von Kamata, et al., 1994, erhaltenen Ergebnissen steht (vgl. oben).

Die gestellte Aufgabe wurde erfindungsgemäß durch eine Zusammensetzung für die Transfektion von höheren eukaryotischen Zellen gelöst, wobei die Zusammensetzung einen Komplex, enthaltend eine in der Zelle zu exprimierende Nukleinsäure sowie, in einer für die Transfektion suboptimalen Konzentration, ein oder mehrere kationische Lipide, sowie gegebenenfalls Helferlipid(e), enthält. Die Zusammensetzung ist dadurch gekennzeichnet, daß sie ein oder mehrere membranaktive saure Peptide enthält, wobei das

Verhältnis der Gesamtzahl von positiven zur Gesamtzahl von negativen Ladungen in der Zusammensetzung ca. 0 bis ca. 3 beträgt.

Vorzugsweise beträgt das Verhältnis der positiven zu den negativen Ladungen in der Zusammensetzung ca. 0 bis ca. 2.

Unter "suboptimaler Konzentration" wird die Menge an kationischem Lipid verstanden, bei der das Verhältnis der positiven Ladungen des kationischen Lipids zu den negativen Ladungen der Nukleinsäure verschieden ist von dem für die jeweilige Transfektion als optimal ermittelten Verhältnis, so daß die mit kationischem Lipid, gegebenenfalls unter Zusatz von Helferlipid, erzielte Transfektionseffizienz geringer ist als bei optimalen Verhältnissen, wobei sich "optimal" auf die infolge der Transfektion erzielte Expression der Nukleinsäure (bzw. im Fall der Verwendung von inhibierender RNA auf das Ausmaß der beabsichtigten biologischen Wirkung) in der Zelle bezieht. Die suboptimale Konzentration kann höher oder geringer sein als die optimale Konzentration.

Die suboptimale Konzentration von kationischem Lipid, gegebenenfalls in Mischung mit Helferlipid, entspricht bevorzugt einer Konzentration, bei der die Transfektionseffizienz um einen Faktor von mindestens ca. 2, vorzugsweise um einen Faktor ca. 5 bis ca. 2.000, geringer ist als bei optimaler Konzentration.

Die für die jeweilige Transfektion optimale Konzentration an kationischem Lipid bzw. die suboptimale Konzentration, bei der Transfektionseffizienz höchstens den halben Wert erreicht wie bei optimaler Konzentration, ist

zelltypabhängig; sie kann im einzelnen durch Titration ermittelt werden, indem das kaionische Lipid, das gegebenenfalls in Mischung mit Helferlipid vorliegt, in steigenden (oder auch fallenden) Konzentrationen eingesetzt wird; zweckmäßig wird zur Bestimmung der Transfektionseffizienz ein Reportergen, z.B. ein Luciferasegen, verwendet.

Membranaktive Peptide sind durch ihre Fähigkeit definiert, Endosomenmembranen zu destabilisieren; sie werden auch als "endosomolytisch wirksame Peptide", "Endosomen aufbrechende Peptide" oder als "fusogene" Peptide bezeichnet. Diese Peptide haben amphipathischen Charakter und können  $\alpha$ -Helices ausbilden; sie sind aufgrund ihrer membranaktiven Eigenschaften für den Einsatz bei Gentransfermethoden geeignet, bei denen die Freisetzung des in die Zelle transportierten genetischen Materials aus den Endosomen einen limitierenden Schritt darstellt, z.B. beim Import von Nukleinsäure in die Zelle über Rezeptor-vermittelte Endozytose.

Als membranaktive Peptide im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet sind Peptide natürlichen Ursprungs oder synthetische Peptide, z.B. die in der WO 93/07283, von Plank et al. 1994, oder von Zauner et al. 1995, veröffentlichten Peptide.

Ob Peptide geeignete membranaktive Eigenschaften aufweisen und somit für die Verwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung in Betracht kommen, kann mit Hilfe von Assays bestimmt werden, die den Vorgang simulieren, der in der Zelle beim Aufbrechen von Endosomen abläuft. Geeignete Assays sind der Liposomen- und der Erythrozyten-Durchlässigkeits-Assay, die z.B. von Plank et al., 1994, beschrieben wurden.



In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die Zusammensetzung ein Peptid der Bezeichnung INF6 mit der Sequenz GLF GAI AGFI ENGW EGMI DGWYG.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die Zusammensetzung ein Peptid der Bezeichnung INF10 mit der Sequenz GLF ELA EGLA ELGW EGLA EGWYGC.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die Zusammensetzung ein Peptid der Bezeichnung INF5 mit der Sequenz [GLF EAI EGFI ENGW EGnIDG]<sub>2</sub> K.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die Zusammensetzung ein Peptid der Bezeichnung EGLA-I mit der Sequenz GLFL GLA EGLA EGLA EGLA EGLA EGL EGLA GGSC.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die Zusammensetzung ein Peptid der Bezeichnung INF4 mit der Sequenz GLF EAI EAFI ENAW EAMI DAWYG.

Weitere geeignete Peptide sind synthetische Peptide der Bezeichnung INF8 mit der Sequenz [GLF EAI EGFI ENGFI EGMI DGGG]<sub>2</sub> K; der Bezeichnung INF9 mit der Sequenz GLF ELA EGLA ELGA EGLA EGWYGC; der Bezeichnung EGLA-II mit der Sequenz WEA GLA EGLA EGLA EGLA EGLA EGL EGLA GGSC; der Bezeichnung EGLA-III mit der Sequenz GLF EGA EGLA EGA EGLA EGLA EGWY GAC und der Bezeichnung EGLA-IV mit der Sequenz GLF EGA EGLA EGW EGLA EGLA EGWY GAC.

Weitere im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete synthetische membranaktive Peptide sind die von Plank et al., 1994, beschriebenen, insbesondere Peptide der Bezeichnung INF4, INF4DI und INF7.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist das membranaktive Peptid mit einem Lipid modifiziert, z.B. mit Dipalmitoylphosphatidylethanolamyl (DPPE); es können auch modifiziertes und nicht-modifiziertes Peptid in der Zusammensetzung enthalten sein. Bei Verwendung eines lipidmodifizierten Peptids kann auf den Zusatz von Helferlipid verzichtet werden.

Als Lipide für die Modifikation des membranaktiven Peptids können grundsätzlich dieselben Lipide verwendet werden, die auch als Helferlipide zum Einsatz kommen; die Auswahl des Lipids wie auch des Peptids erfolgt im allgemeinen, aus praktischen Gründen, vor allem im Hinblick auf die Koppelungsmethode, aufgrund des Vorhandenseins von reaktiven Gruppen. Die Koppelung der Komponenten erfolgt nach literaturbekannten Methoden, z.B. wie von Martin et al., 1989, oder von Remy et al., 1995, beschrieben.

Die Menge, in der das, gegebenenfalls lipidmodifizierte, membranaktive Peptid dem Transfektionskomplex zugesetzt wird, ist abhängig von der positiven Gesamtladung des Lipid/DNA-Komplexes sowie von der Summe der negativen Ladungen des Peptids und dessen Molekulargewicht. Die relative Menge im Verhältnis zum kationischen Lipid (Äquivalente, angegeben in Mol Peptid/Mol kationisches Peptid) bzw. die Menge an verwendeter absoluter Menge, wird im einzelnen aufgrund dieser Parameter berechnet. (Im Fall von INF6 wurden z.B. für 2 Ladungsäquivalente Transfectam, entsprechend 6 nMol, 5 µg INF6, entsprechend 2 nMol, eingesetzt). Im Hinblick auf ein Verhältnis von positiven zu negativen Ladungen von ca. 0 bis ca. 3, vorzugsweise ca. 0 bis ca. 2, kann die Peptidmenge zunächst in Vorversuchen, gegebenenfalls im Vergleich mit anderen Peptiden, variiert und auf diese Weise die optimal wirksame Menge ermittelt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann grundsätzlich jedes mono- oder polykationische Lipid verwendet werden, wobei polykationische Lipide im allgemeinen bevorzugt werden. Aus dem Stand der Technik sind zahlreiche kationische Lipide bekannt, die als Bestandteil der erfindungsgemäßen Zusammensetzung verwendet werden können. Beispiele für geeignete kationische Lipide sind z.B. der WO 95/02698, der WO 91/16024, sowie den Veröffentlichungen von Remy et al., 1994; Solodin et al., 1995; Felgner et al., 1994; Ruysschaert et al., 1994; Weibel et al., 1995; Le Bole'h et al., 1995), auf deren Offenbarung Bezug genommen wird, zu entnehmen.

Besonders bevorzugte kationische Lipide sind Lipopolyamine, z.B. die in der EP-A1 394 111 beschriebenen, insbesondere DOGS (Dioctadecylamidoglycylspermin), das unter dem Handelsnamen "Transfectam" erhältlich ist.

Das kationische Lipid, gegebenenfalls in Mischung mit Helferlipid, ist, wie oben angegeben, in den Transfektionskomplexen in suboptimaler Menge enthalten, d.h. das Verhältnis zwischen den positiven Ladungen des Lipids und den negativen der Nukleinsäure ist größer oder kleiner als das für die optimale Gentransfereffizienz eingesetzte, wobei für die Definition der suboptimalen Menge an kationischem Lipid im Falle der Gegenwart von Helferlipid dessen Wirkung auf die Transfektionseffizienz mitberücksichtigt wird: Es kann z.B. ein Helferlipid die Wirkung von kationischem Lipid bei einer Konzentration, die ohne Helferlipid nur eine suboptimale Effizienz hätte, so verbessern, daß die erzielte Transfektion derjenigen bei optimaler Lipidkonzentration entspricht; die

Gesamtkonzentration der Partner kationisches Lipid/Helferlipid wäre somit in diesem Fall, trotz suboptimaler Konzentration von kationischem Lipid allein, insgesamt optimal.

Bei "Helferlipiden" handelt es sich um neutrale Lipide (natürlichen Ursprungs oder synthetisch), die unter physiologischen Bedingungen zwitterionisch oder frei von Ladungen sind, z.B. Cholesterin, Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE), Oleoyl-palmitoylphosphatidylethanolamin (POPE), Phosphatidylglycerin, Diacylglycerin, etc. Weitere Beispiele für geeignete Helferlipide sind u.a. in der WO 95/18863 und in der WO 95/02698 beschrieben, auf deren Offenbarungen Bezug genommen wird.

Erfindungsgemäß kann die Zusammensetzung ein oder mehrere Helferlipide enthalten.

Bevorzugt als Helferlipide sind die Lipide DOPE, POPE, DOG (1,2-di-Oleoyl-rac-glycerin), MOG (1-Mono-oleoyl-rac-glycerin), EPC (Eiposphatidylcholin), EPE (Eiposphatidylethanolamin).

Vorzugsweise werden die Helferlipide in einer Konzentration, bezogen auf das kationische Lipid, von 0.1 bis 10 Äquivalenten (Mol/Mol) eingesetzt.

Bei den in die Zelle zu transportierenden Nukleinsäuren kann es sich um DNAs oder RNAs handeln, wobei hinsichtlich der Nukleotidsequenz keine Beschränkungen bestehen. Bei der DNA handelt es sich für gentherapeutische Anwendungen vor allem um Gene, die in die Zelle eingeschleust werden, um die Expression therapeutisch wirksamer Genprodukte, die in der Zelle nicht oder nicht in genügend hoher Konzentration

exprimiert werden, zu erzielen. Für therapeutische Zwecke kommen auch inhibierend wirkende Nukleinsäuren, z.B. Antisense-RNA-Moleküle oder Ribozyme bzw. die dafür kodierenden DNA-Moleküle, in Betracht. Beispiele für Nukleinsäuren, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Anwendung kommen können, sind z.B. in der WO 93/07283 und in der WO 95/18863 angeführt.

Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt ein Verfahren zur Transfektion von höheren eukaryotischen Zellen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man die Zellen mit der erfindungsgemäßen Zusammensetzung in Berührung bringt.

Das Verfahren kann bei *in vitro*, *ex vivo* oder *in vivo* Transfektionen zur Anwendung kommen, bevorzugt für die Transfektion von Säugetierzellen. *In vitro* wird das Verfahren vor allem auf Zellkulturen (adhärent oder in Suspension) angewendet. Anwendungen *ex vivo* sind gentherapeutische Anwendungen, bei denen dem zu behandelnden Organismus Zellen entnommen und *ex corpore* mit einem therapeutisch wirksamen Nukleinsäuremolekül, transfiziert werden, um anschließend wieder in den Organismus rückgeführt zu werden, wo das Genprodukt exprimiert wird und seine therapeutische Wirkung entfaltet. Ein Beispiel für eine *ex vivo* Anwendung ist die Herstellung von Tumorstoffen aus autologen Zellen, die mit einem Zytokin-Gen transfiziert sind.

Für Anwendungen *in vivo* wird dem Organismus die erfindungsgemäße Zusammensetzung in Form einer pharmazeutischen Zubereitung, die ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist, verabreicht, vorzugsweise intravenös oder, bei der Behandlung von Tumorerkrankungen, intratumoral.

Für die pharmazeutische Zubereitung können der erfindungsgemäßen Zusammensetzung pharmazeutisch annehmbare Zusatzstoffe sowie inerte Träger, z.B. Kochsalzlösung oder phosphatgepufferte Kochsalzlösung oder jeder Träger, in dem die Zusammensetzungen geeignete Löslichkeitseigenschaften haben, beigegeben werden. Bezüglich der Formulierung pharmazeutischer Zubereitungen wird auf Remington's Pharmaceutical Sciences, 1980, Bezug genommen.

Die Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung kann abgewandelt werden, um für Anwendungen mit anderen anionischen Molekülen als Nukleinsäure eingesetzt zu werden, z.B. um anionische Proteine in höhere eukaryotische Zellen zu befördern.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde überraschend festgestellt, daß die Transfektionseffizienz des kationischen Lipids Transfectam (Behr, et al., 1989), wenn es bei geringem positivem Ladungsüberschuß (1.5 und 2 Ladungsäquivalente), d.h. bei suboptimaler Konzentration, eingesetzt wird, mittels membranaktiven sauren Peptiden signifikant verstärkt werden kann.

Die Verstärkung war im Falle des Peptids INF6 (2 µg/1.5 Ladungsäquivalente Transfectam) bis zu 1.000fach, was an das Niveau der mit optimalen Mengen Transfectam (hoher positiver Ladungsüberschuß) erzielten Genexpression heranreicht. Die Verstärkung der Genexpression mit membranaktiven Peptiden wurde bei mehreren Zelltypen beobachtet. Unter den getesteten membranaktiven Peptiden brachten nur die sauren gute Ergebnisse in Kombination mit Transfectam. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit der Hypothese, daß die Peptide für eine verbesserte Freisetzung der DNA aus den Endosomen in denselben endozytotischen Vesikeln

lokalisiert sein müssen wie die Lipid/DNA-Komplexe, was dann gewährleistet ist, wenn die Peptide ionisch an die Transfektionspartikel gebunden sind. Beim Einsatz von 2 Ladungsäquivalenten Transfectam war die Reihenfolge der Leistungsfähigkeit der Peptide INF6>INF10>EGLA-I<sub>2</sub>>INF5>INFA>Melittin. Diese für die untersuchten Peptide mit Transfectam erhaltenen Ergebnisse weichen von Befunden ab, die erhalten wurden, wenn die Peptide im Transfektionssystem auf der Grundlage der rezeptorvermittelten Endozytose als Bestandteil von Transfektionskomplexen, enthaltend Transferrin-Polylysin, eingesetzt wurden: in diesem System war INF5 das beste Peptid und ca. 50fach wirksamer als INF6, während es in Kombination mit Transfectam 10 mal weniger wirksam ist als INF6. Das Peptid INF5 hat eine membranaufbrechende Wirkung nur bei saurem pH-Wert, während INF6 auch bei neutralem pH-Wert membranaktiv ist. Im lipidfreien Gentransfersystem auf der Grundlage von Polylysin-konjugierten zellulären Liganden war die Aktivität des Peptids bei neutralem pH-Wert von toxischen Nebeneffekten begleitet, die nicht beobachtet wurden, wenn das Peptid im Lipid-System eingesetzt wurden. Das künstliche Peptid EGLA-I sowie INF10 zeigten sich als Zusatz zu Lipid/DNA-Komplexen geeigneter als in Polylysin enthaltenden Komplexen.

Es wurde ferner festgestellt, daß die Wirkung der getesteten Peptide auf die Transfektionseffizienz von kationischen Lipiden bei suboptimalem Ladungsverhältnis in derselben Größenordnung lag wie die Wirkung von Helferlipiden (Remy, et al., 1995; Zhou, et al., 1994; Felgner, et al., 1994; Leventis, et al., 1990).

Die Transfektionskomplexe, enthaltend kationisches Lipid und membranaktives Peptid, können nach verschiedenen Methoden hergestellt werden. In den

Versuchen der vorliegenden Erfindung wurden die Zusammensetzungen nach drei verschiedenen Methoden hergestellt, wobei sich die Methoden in der Reihenfolge der Zugabe bzw. Vereinigung der Komplexkomponenten sowie hinsichtlich des Zeitpunktes der Verdünnung unterschieden. Bei der ersten Variante wurde die DNA nach der Vereinigung von Peptid mit Transfectam zugegeben; in der zweiten Variante wurde zuerst Transfectam mit DNA komplexiert und anschließend das Peptid zugegeben. Bei der dritten Variante wurde das Peptid nach Verdünnung des Transfectam/DNA-Komplexes zugegeben. Es wurde untersucht, ob die Art der Herstellung der Transfektionskomplexe einen Einfluß auf das Ausmaß der Steigerung der Transfektionseffizienz hat. Dabei zeigte sich, daß sich die Herstellungsmethode auf die verschiedenen Peptide unterschiedlich auswirkt: Für INF6 erwiesen sich die drei Herstellungsmethoden als gleichwertig. Bei INF5 brachten die nach der zweiten und dritten Methode hergestellten Transfektionskomplexe bessere Ergebnisse, während bei INF10 die erste und dritte Variante der zweiten überlegen waren.

Unabhängig von der Herstellungsmethode verändert die Vereinigung der mutanten Influenza-peptide, die insgesamt eine negative Ladung aufweisen, mit kationischen Lipiden den Ladungszustand der Transfektionspartikel, wobei einige dieser peptidhaltigen Komplexe nahe der Elektroneutralität sind, weil die mutanten Influenza-peptide insgesamt eine negative Ladung aufweisen, (s. Insert von Fig. 1).

In den Versuchen der vorliegenden Erfindung wurden ferner hochwirksame DNA-Komplexe, die bei niedriger Ladung (2 Ladungsäquivalente Transfectam) das Helferlipid DOPE enthielten (Remy, et al., 1995), mit



den ein membranaktives Peptid enthaltenden Komplexen der vorliegenden Erfindung hinsichtlich ihrer Transfektionseffizienz verglichen. Nachdem die Verstärkung durch DOPE auf dessen fusogene Aktivität zurückgeführt worden war (Allen, et al., 1990; Litzinger und Huang, 1992), lassen die im Rahmen der vorliegenden Erfindung erhaltenen FACS-Daten (Fig. 3) auf einen weiteren wichtigen Effekt des Helferlipids schließen: die Zellassoziierung der Transfektionskomplexe ist wesentlich stärker ausgeprägt, wenn zu 2 Ladungsäquivalenten Transfectam 1.5 Äquivalente DOPE beigegeben werden, als wenn das Lipospermin allein verwendet wird. Es zeigte sich, daß das membranaktive Peptid keine Steigerung der optimal wirksamen, das Helferlipid enthaltenden Komplexe herbeiführte, während bei Verwendung von Transfectam im Überschuß (6 Ladungsäquivalente), also bei Einsatz einer suboptimalen Menge, eine signifikante Steigerung der Genexpression im Vergleich zu den mit optimalen Mengen von Transfectam allein erzielten Werten erhalten wurde.

Außerdem wurde festgestellt, daß das membranaktive Peptid die Empfindlichkeit der Transfektionskomplexe gegenüber Serum verringert, was im Hinblick auf die Anwendung *in vivo* von Bedeutung ist.

#### Figurenübersicht

Fig. 1: Transfektionseffizienz von Transfectam/DNA/INF6-Komplexen

Fig. 2: Wirkung von Serum auf die Transfektionseffizienz

Fig. 3: A: Durchflußzytometrieanalyse  
B: Genexpression

Fig. 4: Wirkung verschiedener membranaktiver Peptide auf  
die Transfektionseffizienz

Fig. 5: Einfluß der Herstellungsmethode von  
membranaktives Peptid enthaltenden  
Transfektionskomplexen auf die  
Transfektionseffizienz

Fig. 6: Effizienz von membranaktives Peptid enthaltenden  
Komplexen bei Transfektion verschiedener  
Zelllinien

Fig. 7: Einfluß von Bafilomycin A1 auf die  
Transfektionseffizienz

Fig. 8: Einfluß von Helferlipiden auf die  
Transfektionseffizienz

Fig. 9: Einfluß der Kombination von Transfectam,  
Helferlipid und membranaktivem Peptid auf die  
Transfektionseffizienz

Fig. 10: Wirkung eines lipidmodifizierten  
membranaktiven Peptids auf die  
Transfektionseffizienz

In den folgenden Beispielen wurden, wenn nicht anders  
angegeben, die folgenden Materialien und Methoden  
verwendet:

a) Reporterergenplasmid pCMV-Luc

Die Konstruktion des Plasmids pCMV-Luc, das das Luciferasegen unter der Kontrolle des CMV-Promotor/Enhancers trägt, wurde unter der Bezeichnung pCMVL in der WO 93/07283 beschrieben.

b) Diverse Reagentien

Das Lipopolyamin DOGS (Diocadecylamidoglycylspermin) mit dem Handelsnamen "Transfectam" wurde von Promega bezogen, die Helferlipide DOPE (1.2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin), MOG (1-Mono-oleoyl-rac-glycerin), DOG (1.2-di-Oleoyl-rac-glycerin), EPE (Eiphoosphatidylethanolamin), EPC (Eiphoosphatidylcholin), sowie Chloroquin, Bafilomycin A<sub>1</sub> und Melittin (aus Bienengift) wurden von Sigma bezogen.

c) Peptidsynthese

Die Bezeichnung der Peptide, ihre Herkunft sowie Sequenzen sind in der Tabelle angegeben.

Die Peptide der Bezeichnung INF5 und INF6 wurden synthetisiert, wie von Plank, et al., 1994, beschrieben.

Die Peptide INF4, INF10 und EGLA-I wurden unter Verwendung der Fmoc-Strategie (N-(9-Fluorenyl)methoxycarbonyl) mit HBTU-Aktivierung [O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat], (Fastmoc<sup>TM</sup> - 0.25 mmol Maßstab) auf einem Applied Biosystems Peptidsynthesizer Modell 433 A (Foster City,

Kalifornien) mit Feedback-Monitoring synthetisiert. Pro Zyklus wurden drei Entschützungs-schritte ("Deprotection") durchgeführt. Wenn das Feedback-Monitoring ergab, daß die Fmoc-Entschützung nicht quantitativ war, wurde im folgenden Schritt eine Doppelkoppelung der nächsten Aminosäure und Blockierung der endständigen NH<sub>2</sub>-Gruppen (mittels Essigsäureanhydrid) vorgenommen. Es wurden die folgenden Aminosäureschutzgruppen verwendet: (Trt)Asn, (Trt)Cys, (t-Bu)Cys, (t-Bu)Asp, (t-Bu)Glu, (Boc)Lys. Als Lösungsmittel wurde eine Mischung von 70 % NMP/30 % DMF verwendet.

Für EGLA-I wurde ein HMP-Harz (Tentagel R PHB, 0.22 mmol/g, Rapp Polymere) verwendet. Die Peptide wurden bis zum Rest Gly-30 gemeinsam synthetisiert, dann wurde die halbe Harzmenge für die Synthese von EGLA-I verwendet.

Die Peptide INF10 und INFA wurden auf einem Cys(Trt)-vorbeladenen aminomethylierten Polystyrolharz mit einem p-Carboxytritylchlorid-Linker (0.52 mmol/g; PepChem, Tübingen, Deutschland) unter Verwendung von DMF als Lösungsmittel synthetisiert.

Das Peptid der Bezeichnung INF7dimer (ein Dimeres des von Plank et al., 1994, beschriebenen Peptids INF7) wurde unter Verwendung der Fmoc-Strategie auf einem Applied Biosystems Peptidsynthesizer Modell 431 synthetisiert. Es wurde ein mit Cystein vorbeladenes Harz verwendet (Tentagel S PHB-Cys). Als erste Aminosäure wurde das mittelständige Lys DiFmoc-gekoppelt. Danach wurden bis Ile-18 Doppelkoppelungen durchgeführt. Von Met-17 bis Ile-10 wurden Einfachkoppelungen durchgeführt; bei Phe-9 eine Einfachkoppelung, dann zusätzliche Koppelung mit

1% Triton im Kopplungsansatz. Ab Gly-8 wurden einfache Koppelungen durchgeführt.

Die Entschüttung der Peptide und die Abspaltung vom Harz wurden mit einer Mischung von Phenol, Ethandithiol, Thioanisol, Wasser und Trifluoressigsäure (0.75:0.25:0.5:0.5:10) durchgeführt. Die Rohpeptide wurden durch tropfenweise Zugabe zu Ether ausgefällt und zentrifugiert. Die so gewonnenen Peptide wurden dreimal mit Ether gewaschen und anschließend unter einem Argonstrom, gefolgt von Hochvakuum, getrocknet. Die Rohpeptide wurden in 1 M TEAB, pH 9 und 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol gelöst.

Die Reinheit der Peptide wurde mittels analytischer Umkehrphasen-HPLC unter Einsatz einer C-18 Säule (Vydac 218ATP54, 2.1 mm x 25 cm, 5  $\mu$ m) bestimmt. Dabei wurde ein binäres Lösungsmittelsystem (Lösungsmittel A: wässrige 0.1 % Trifluoressigsäure; Lösungsmittel B: Acetonitril, enthaltend 0.1 % Trifluoressigsäure) bei einem Gradienten von 0 - 100 % in 45 Minuten bei einer Flußrate von 1 ml/min verwendet. Eine analytische Ionenaustauschchromatographie (SuperQ-Toyopearl 650, TosoHaas, 5 mm x 50 mm Säule) wurde unter Verwendung eines Salzgradienten (20 mM HEPES, pH 7.3, 0 - 1.5 M NaCl in 60 min, Flußrate 0.5 ml/min) durchgeführt.

Das Peptid EGLA-I wurde einer Gelfiltration (Sephadex G10, 20 mM TEAA, pH 7.3) unterworfen. Die gereinigte Peptidfraktion wurde in einem Speedvac (Savant) gefriergetrocknet. Die analytische Umkehrphasen-Chromatographie zeigte eine Reinheit von ca. 95 %.

Die Lösungen der Rohpeptide INF10 und INFA wurden mittels Gelfiltration auf Sephadex G10 (10 mm x 300 mm Säule) in 20 mM TEAA, pH 7.3 fraktioniert. Die Peptide wurden lyophilisiert; die analytische Umkehrphasen-Chromatographie ergab eine Reinheit von ca. 98 bzw. 95 %.

Das Peptid INF7dimer wurde über Sephadex G 10 gereinigt (Puffer HBS; Säule 10mm x 300mm). Dann wurde eine Ionenaustauschchromatographie durchgeführt (Säule: (10mm x 100mm); Material: Toso Haas Super Q 650 S; Durchflußrate: 0.5 ml/min; Eluens: A: 20 mM Hepes 7.3, B: 3 M NaCl/20 mM Hepes 7.3; Gradient: 0 - 40 min 0% B, 40 - 140 min 100% B, d.h. 1%/min). Das Peptid eluierte bei 70 - 80 min. Das über Ionenaustauscher gereinigte Peptid wurde nochmals über eine Sephadex G 10 Säule (10mm x 300mm) gereinigt (Puffer HBS/50% Glycerin).

Die Identität der Peptide wurde bestimmt, wie von Plank, et al., 1994, beschrieben. Die Peptide wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Der Liposomendurchlässigkeits-Assay ("Liposomen Leakage Assay") wurde durchgeführt, wie von Plank, et al., 1994, beschrieben.

#### d) Zellkultur und Medien

Die Medien sowie fötales Kälberserum (FCS) und Pferdeserum wurden von Gibco-BRL bezogen. Die Kulturmedien wurden mit 2 mM L-Glutamin und Antibiotika ergänzt. Als Zellen wurden primäre humane Melanomzellen der Bezeichnung H225, Mausembryo-Leberzellen der Zelllinie TIB-73 (ATCC BNL CL.2), humane Lungenkarzinomzellen der Zelllinie A549 (ATCC CCL 185) und Zellen der Maus-Melanomzelllinie Cloudman S91, Klon

M3 (ATCC No. CCL 53.1) verwendet. Die H225-Zellen wurden in RPMI 1640/10 % FCS/1 mM Natriumpyruvat, die A549-Zellen in DMEM/10 % FCS, die BNL CL.2-Zellen in Hochglukose-DMEM/10 % FCS und die M3-Zellen in Ham's F10-Medium/15 % Pferdeserum/5 % FCS gezüchtet.

e) Transfektion der Zellen

i) Herstellung von kationischen Lipid/DNA-Komplexen

Die Komplexe wurden hergestellt, wie von Barthel, et al., 1993, beschrieben, wobei 3 µg Plasmid-DNA und die jeweils eingesetzte Menge von Transfectam in je 75 µl 150 mM NaCl gelöst wurden. Nach 10 bis 20 min wurden die beiden Lösungen vereinigt. Nach weiteren 10 min wurde die Mischung mit serumfreiem Medium auf ein Gesamtvolumen von 2 ml verdünnt.

Der Ausdruck "Ladungsäquivalent" gibt die Menge an kationischem Lipid an, die für eine Transfektion verwendet wurde; 1 Ladungsäquivalent entspricht der Menge, die erforderlich ist, um alle negativen Ladungen der Phosphatgruppen des Plasmids zu neutralisieren. 3 µg DNA entsprechen 9 nMol negativer Ladungen; bei der Berechnung des Ladungsverhältnisses wurde berücksichtigt, daß 1 Mol Transfectam 3 Mol positive Ladungen aufweist, die von den drei bei physiologischem pH-Wert protonierten Ammoniumgruppen stammen. Ausgehend vom Molgewicht ca. 1250 bedeutet das, daß man bei Verwendung von 3 µg DNA für einen zweifachen positiven Ladungsüberschuß (2 Ladungsäquivalente Transfectam/3 µg DNA) 3 µl einer 2mM Transfectamlösung, enthaltend 6nmol (=7.58 µg) Transfectam benötigt.

Die Peptide wurden in einer Menge von 0.5 oder 1 mg/ml Lösung in HBS (HEPES-gepufferte Salzlösung, enthaltend

150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.3) zu den Transfectam/DNA-Komplexen gegeben. Nach einer 10 bis 20 minütigen Reifungszeit wurde das Transfektionsvolumen mit Kulturmedium auf 2 ml gebracht, von der erhaltenen Transfektionsmischung wurde 1 ml auf die Zellen pipettiert.

Die Helferlipide DOPE, DOG, EPC, EPE bzw. MOG oder Cholesterin wurden in Ethanol, enthaltend eine Spur Dichlormethan, verdünnt. Die Transfectam/Helferlipid/DNA-Komplexe wurden gebildet, indem die jeweiligen Mengen an Transfectam/Helferlipid (die Menge an verwendetem Helferlipid, bezogen auf Transfectam, wird als Molverhältnis angegeben) vor der Verdünnung mit der DNA-Lösung gemischt wurden.

#### ii) Transfektion und Luciferase-Bestimmung

50.000 bis 75.000 Zellen pro Vertiefung einer 24 Well-Platte wurden einen Tag vor der Transfektion ausplattiert, wobei bei allen Versuchen das Transfektionsvolumen 1 ml betrug. Die Transfektion wurde mit 1 ml des in i) hergestellten Komplexes durchgeführt. Nach 3 bis 4 h wurde das Transfektionsmedium durch frisches Medium, enthaltend 10 % FCS, ersetzt. Jedes Experiment wurde, sofern nicht anders angegeben, mindestens zweifach durchgeführt, wobei sich die in den Abbildungen angegebenen Peptidmengen in diesen Fällen auf die insgesamt für die Doppelbestimmung eingesetzte Menge beziehen.

24 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und in 150 - 200 µl 250 mM Tris pH 7.3, 0.5 % Triton X-100 aufgenommen. Das Zellysate wurde dann in 1.5 ml Eppendorfröhrchen überführt und 5 min bei 14.000 g zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu



pelletieren. Die Bestimmung der Luciferaseaktivität wurde durchgeführt, wie in der WO 93/7283 beschrieben, wobei die Luciferase-Lichteinheiten von einem Aliquot des Überstandes (20 µl) mit 10 sec Integration nach Injektion von frisch zubereiteter Luciferinlösung bestimmt wurde. Der Luciferasehintergrund (150 - 250 Lichteinheiten) wurde von jedem Wert abgezogen; die Transfektionseffizienz wurde ausgedrückt als Gesamtlichteinheiten, welche den Mittelwert von Doppelbestimmungen darstellen. Zur quantitativen Bestimmung des Proteingehalts wurde der Bradford-Assay (Bio-Rad) verwendet.

#### f) Durchflußzytometrie

Für die Durchflußzytometrie wurde die Plasmid-DNA mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff YOYO-1, (beschrieben von Rye, et al., 1992; Hirons, et al., 1994, erhältlich von Molecular Probes; ca. 1 Farbstoffmolekül pro 300 bp) inkubiert, danach wurden, wie oben beschrieben, die Komplexe hergestellt. Die Komplexe wurden auf 300.000 H225-Zellen pro Vertiefung einer 6 Well-Platte gegeben, dann wurde 4 h lang entweder bei 4°C (Zelloberflächenassoziation) oder bei 37°C (Zelloberflächenassoziation und Aufnahme in die Zellen) inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit 1 mM EDTA in PBS geerntet und auf einem FACScan-Gerät (Becton Dickinson) analysiert.

#### Beispiel 1

Transfektionseffizienz von Transfectam/DNA/INF6-Komplexen

Es wurden Komplexe von 1, 1.5, 2 oder 4 Ladungsäquivalenten Transfectam pro 3 µg pCMV-Luc in Kombination mit steigenden Mengen des membranaktiven, sauren, vom Influenzavirus stammenden Peptid INF6 hergestellt und mit RPMI 1640 Kulturmedium gemischt. Die erhaltenen Komplexe wurden auf H225-Zellen (75.000 Zellen pro Vertiefung einer 24 Well-Platte) aufgebracht. Nach 4 h wurde das Transfektionsmedium durch frisches RPMI-Medium, enthaltend 10% FCS ersetzt. Das Ergebnis der Versuche ist in Fig. 1 dargestellt (gepunktete Linie mit Rhomben: 1 Äquivalent (eq.) Transfectam /x µg INF6; volle Linie mit Kreisen: Transfectam 1.5 eq./x µg INF6; strichlierte Linie mit Quadraten: Transfectam 2 eq./x µg INF6; volle Linie mit Dreiecken: Transfectam 4 eq./x µg INF6). Es zeigte sich, daß bei Verwendung von 2 bzw. 1.5 Ladungsäquivalenten Lipid eine 100 bis 1.000fache Steigerung der Transfektionseffizienz, gemessen als Luciferaseaktivität, erzielt wurde. Beim Einsatz von bereits optimalen Bedingungen (4 Ladungsäquivalente kationisches Lipid) wurde nur eine geringe Steigerung (ca. 1.5 bis 5fach) erhalten. Da das Peptid INF6 bei pH 7 vier negative Ladungen hat, kann es über elektrostatische Wechselwirkungen mit den kationischen Lipid/DNA-Partikeln assoziieren. Bei Verwendung von neutralen Partikeln (1 Ladungsäquivalent) wurde keine Verstärkung beobachtet, vermutlich weil an diese Komplexe nur wenige Peptide binden können. Es könnten sogar Wechselwirkungen mit der Zellmembran vermindert werden, weil positive Restladungen durch die Assoziation mit dem Peptid maskiert werden. Das Insert von Fig. 1 zeigt die Transfektionseffizienz der Transfectam/DNA/INF6-Komplexe, aufgetragen gegen das theoretische Ladungsverhältnis der Komplexe. Unter der Annahme, daß beinahe das gesamte Peptid an die transfizierenden Partikel bindet, wird eine hohe

Luciferaseexpression mit elektroneutralen (oder nahezu neutralen) Lipid-Vektoren erzielt.

#### Beispiel 2

##### Wirkung von Serum auf die Transfektionseffizienz

Es wurden Transfektionen von H225-Zellen vorgenommen, wobei die in Fig. 2 angegebenen Mengen Transfectam (in Ladungsäquivalenten) und das Peptid INF6 verwendet wurden. Die Transfektionen wurden einerseits ohne Serum (leere Balken), andererseits in Gegenwart von 10% (gepunktete Balken) bzw. 20% (graue Balken) nicht hitzeinaktiviertem FCS vorgenommen (Fig. 2). Es zeigte sich, daß die Peptid enthaltenden Komplexe eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Serum aufwiesen.

#### Beispiel 3

##### Assoziation von Transfectam/DNA-Komplexen und Expressionsrate

###### a) Durchflußzytometrie-Analyse von Transfektionskomplexen

Die Analyse wurde mit H225-Zellen durchgeführt, wie im Methodenteil beschrieben. Wie in Fig. 3A dargestellt, ändert sich die Assoziierung der Transfectam/DNA-Komplexe mit der Zelloberfläche entscheidend mit dem Ladungsverhältnis: mit 2 Ladungsäquivalenten wurde eine heterogene Zellpopulation gefunden, während bei 4 Ladungsäquivalenten eine klassische Gauß-Kurve gefunden wurde. Der Zusatz von membranaktiven Peptiden zu 2 (oder 4) Ladungsäquivalenten Transfectam brachte

keine wesentliche Änderung des Kurvenprofils sowohl bei 4°C als auch bei 37°C.

#### b) Genexpression

Es wurde, parallel zu den in a) durchgeführten Tests, die Genexpression von 300.000 Zellen nach Inkubation bei 4°C und 37°C mit verschiedenen Transfektionskomplexen gemessen (die Zellen wurden bei 4°C oder bei 37°C inkubiert, nach 4 h zweimal mit PBS gewaschen, mit frischem Medium, enthaltend 10% FCS versetzt und 20 h lang bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert). Die Gegenwart von Peptid (1.5 µg/Well; bei diesem Experiment wurde eine Einfachbestimmung vorgenommen) bewirkte beim Ansatz bei 4°C eine 15fache und beim Ansatz bei 37°C eine 100fache Verstärkung der Expression. (Fig. 3B. Leere Balken: Genexpression nach Inkubation bei 4°C; gefüllte Balken: Genexpression nach Inkubation bei 37°C).

#### Beispiel 4

##### Wirkung verschiedener Peptide

Wie im Methodenteil beschrieben, wurden Transfectam/DNA-Komplexe aus 2 Ladungsäquivalenten Transfectam pro 3 µg DNA hergestellt. Für einige Experimente enthielten die Komplexe die in Fig. 4 angegebenen Peptide in den jeweils angegebenen Mengen. Die Peptide INF6, INFA und Melittin, die eine gute hämolytische Aktivität besitzen, ohne eine ausgeprägte Spezifität für niedrige pH-Werte zu haben, zeigten ein unterschiedliches Verhalten: INFA und INF6 verstärkten die Transfektionseffizienz von 2 Ladungsäquivalenten Transfectam um das 10 bzw. 200fache, während Melittin

die Luciferaseexpression nur geringfügig verstärkte. Darüberhinaus war Melittin bei einer Menge von 5 µg/Doppelbestimmung hochtoxisch. Die Influenzaeptid-Mutanten INF5 und INF10, von denen sich im Liposomendurchlässigkeitstest gezeigt hatte, daß sie bei pH 5.0 Calcein effizient freisetzen, (Plank, et al., 1994) brachten bessere Ergebnisse als INF4, waren aber weniger wirksam als INF6. Außerdem wurde ein nicht von der HA2-Sequenz des Influenzavirus abgeleitetes Peptid der Bezeichnung EGLA-I getestet, in dem einer der Alaninreste im GALA-Repeat (Parente, et al., 1988) durch einen Glycinrest ersetzt wurde. Dieses Peptid gab ebensogute Ergebnisse wie INF5.

#### Beispiel 5

Einfluß der Herstellungsmethode von Transfectam/DNA/Peptid-Komplexen auf die Effizienz der Transfektion von H225-Zellen

Es wurden Komplexe auf drei verschiedene Arten hergestellt (Fig. 5):

- a) Vereinigung von Peptid und Lipid vor der Komplexierung mit DNA (gepunktete Balken)
- b) Zugabe des Peptids nach Bildung des Transfectam/DNA-Komplexes vor Verdünnung mit Medium (150 µl Volumen; graue Balken)
- c) Zugabe des Peptids nach Verdünnung der Komplexe mit dem Kulturmedium (2 ml Volumen; schwarze Balken)

Wie die in Fig. 5 dargestellten Ergebnisse zeigen, hängt der Einfluß der Herstellungsmethode auf die Genexpressionsrate von der Peptidsequenz ab. Die Vereinigung des Peptids mit Transfectam vor der Komplexierung mit dem Plasmid ergab ein konträres

Verhalten der Peptide: während die Genexpressionsrate bei INF6 unverändert blieb, war bei INF10 die Leistungsfähigkeit der so hergestellten Komplexe fünfmal besser als bei nach der Standardmethode (s. Methodenteil) erhaltenen Komplexe. Im Gegensatz dazu bewirkte diese Methode der Komplexherstellung bei INF5 eine starke Verringerung der Genexpression.

#### Beispiel 6

Wirkung der Peptide auf die Transfektionseffizienz verschiedener Zelllinien

Daß die Wirkung der Peptide auf den Gentransfer mittels Lipiden nicht auf bestimmte Zelltypen beschränkt ist, sondern ein allgemeines Phänomen, zeigte sich in Versuchen mit Zellen verschiedener Zelllinien, die in Fig. 6 dargestellt sind (H225-Zellen: leere Balken; BNL CL.2-Zellen: gepunktete Balken; A549-Zellen: hellgraue Balken; M3-Zellen: dunkelgraue Balken). Dazu wurden Komplexe aus Transfectam, pCMV-Luc 5 µg INF6 hergestellt und die Effizienz der Komplexe auf den Zellen getestet. (Als Vergleichswert wurde Transfectam bei einem Ladungsüberschuß von 4 Ladungsäquivalenten verwendet, obwohl es nicht auf allen getesteten Zellen die höchsten Werte gibt.) Es wurden bei allen Zelllinien Steigerungsraten der Transfektionseffizienz festgestellt, wenn die Transfektionskomplexe ein membranaktives Peptid enthielten.

#### Beispiel 7

Untersuchung des Einflusses von Bafilomycin A<sub>1</sub> auf die Transfektionseffizienz von Transfectam/DNA-Komplexen

Die Gegenwart des spezifischen Inhibitors der Vakuolen-Protonenpumpe Bafilomycin A<sub>1</sub> (Bowman, et al., 1988; Yoshimori, et al., 1991) in einer Konzentration von 200 nM bei der Transfektion von H225-Zellen (es wurden 2 Ladungsäquivalente Transfectam bzw. 2 Ladungsäquivalente Transfectam plus INF10 bzw. INF6 eingesetzt; nach 4 h Inkubation wurde das Medium durch frisches mit einem Gehalt von 10 % FCS ersetzt) verminderte die Genexpression um einen Faktor 7, 5 bzw. 1.5 (Fig. 7. Leere Balken: ohne Zusatz von Bafilomycin A<sub>1</sub>. Gepunktete Balken: In Gegenwart von 200 nM Bafilomycin A<sub>1</sub>). Beim Einsatz von 4 Ladungsäquivalenten Transfectam konnte Bafilomycin keine Verringerung des Gentransfers bewirken.

#### Beispiel 8

Untersuchung des Einflusses von Helferlipiden auf die Effizienz von Transfectam/DNA-Komplexen

##### a) Verstärkung der Wirkung von Transfectam durch Helferlipide

Es wurden die in Fig. 8 angegebenen Helferlipide in einem molaren Verhältnis von 2 Ladungsäquivalenten Transfectam zu 1 bis 3 Äquivalenten Helferlipid eingesetzt. Dies ergab für DOPE, EPE oder DOG eine 10 bis 20fach höhere Genexpression (s. auch Fig. 3B). MOG verstärkte die Expression um das ca. 4fache, während EPC und Cholesterin die Transfektionseffizienz auf H225-Zellen nicht verstärken konnte.

Eine weitere, bis zu 7fache Verstärkung konnte erzielt werden, wenn der Transfectam/DOPE-Formulierung 1 mol/% DOG beigemischt wurde; dies ist vermutlich auf die Fähigkeit von DOG zurückzuführen, u.a. eine Fusion zu induzieren (Siegel, et al., 1989).

Mit Transfektionskomplexen, enthaltend das Helferlipid DOPE (1.5 Mol pro 2 Mol Transfectam; das sind 9 nMol DOPE, entsprechend 6.7 µg), wurde, wie in Beispiel 3 a) beschrieben, eine Durchflußzytometrie durchgeführt. Es ergab sich eine deutliche Veränderung des FACScan-Profiles (Fig. 3A): die Zellpopulation ist homogener und die Zellassoziierung (sowie auch die Aufnahme in die Zellen bei 37°C, nicht in der Figur dargestellt) ist stärker als ohne Helferlipid. Wenn die Luciferaseaktivität aus einem bei 4°C durchgeführten Experiment, bei dem 2 Ladungsäquivalente Transfectam und 1.5 Äquivalente DOPE, 24 h später gemessen wurde, zeigte sich, daß die DOPE enthaltenden Komplexe 8 bzw. 280 mal besser waren, als 4 bzw. 2 Ladungsäquivalente des kationischen Lipids allein (Fig. 3B). Wenn der Versuch bei 37°C durchgeführt wurde, waren die Unterschiede in der Luciferaseexpression 2 bzw. 640fach.

b) Verstärkung der Wirkung von Transfectam durch  
Helferlipide und membranaktive Peptide

Nach Herstellung von Transfectam/DNA/DOPE-Komplexen wurden steigende Mengen INF10 beigegeben. Nach einer Reifungszeit von 10 - 20 min wurde serumfreies Kulturmedium auf ein Gesamtvolumen von 2 ml beigegeben; 1 ml der Transfektionsmischung wurde auf jede Vertiefung der Doppelbestimmung aufgebracht. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Fig. 9 dargestellt (leere Balken:Transfectam, gepunkteter Balken:



Transfectam 6 eq./Transfectam/DOPE 0.36 eq., gefüllte Balken: Transfectam 6 eq./Transfectam/DOPE 0.36 eq./x  $\mu\text{g}$  INF10). Die Gegenwart von membranaktivem Peptid ergab bei Komplexen mit hoher Effizienz (Transfectam 2 eq./INF10 3  $\mu\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}$  oder 7,5  $\mu\text{g}$ /1.5 eq. DOPE) keine weitere Steigerung (nicht in Fig. 9 gezeigt). Wenn jedoch das Peptid zusammen mit einem Überschuß von Transfectam (6 Ladungsäquivalente) verwendet wurde, konnte gegenüber den mit optimalen Mengen Transfectam/DOPE erhaltenen Werten eine signifikante Steigerung der Genexpression erhalten werden; die Werte mit 6 eq./Transfectam/0.36 eq. DOPE/10  $\mu\text{g}$  INF10 waren 6x besser als die mit 2 eq./Transfectam/1.5 eq. DOPE/7.5  $\mu\text{g}$  INF10.

#### Beispiel 9

Wirkung eines lipidmodifizierten membranaktiven Peptids auf die Transfektionseffizienz

##### a) Herstellung von modifiziertem Peptid (DPPE-INF7dimer)

Das Peptid der Bezeichnung INF7dimer (vgl. Tabelle), ein Dimeres des von Plank, et al., 1994 beschriebenen Peptids INF7, wurde an das Lipidderivat DPPE-(Dipalmitoylphosphatidylethanolamyl)Bromacetamid (Hexadecansäure-3-((2-(2-(2-(2-(2-(2-Bromacethylamino)ethoxy)ethoxy)ethoxy)-2-acetylamino)ethoxy)hydroxyphosphoryloxy)-2-hexadecanoyloxypropylester) gekoppelt, indem 0.95 Äquivalente Peptid (80 nmol; ca. 450  $\mu\text{g}$ ) zu dem in 1.3ml Diethanolaminpuffer (pH 9.5/Ethanol; 9/1; v/v) verdünnten Lipid zugegeben wurden. Nach 3 h bei Raumtemperatur wurde ein Ellman-Test zur quantitativen

Bestimmung der Thiolreste durchgeführt. Anschließend wurde zwecks Zerstörung der restlichen Bromacetamidgruppe  $\beta$ -Mercaptoethanol zugegeben. Das erhaltene lipidmodifizierte Peptid wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

b) Transfektion von BNL CL.2-Zellen

1.5 eq. Transfectam wurden in 75  $\mu$ l 0.15 M NaCl verdünnt, intensiv gemischt, worauf die in Fig. 10 angegebenen Mengen an DPPE-INF7dimer (die in der Fig. angegebenen Werte sind Mol%, bezogen auf die Gesamtmenge an Transfectam) zugegeben wurden. Anschließend wurde gut gemischt, nach 10 min wurden 3  $\mu$ g DNA in 75  $\mu$ l NaCl beigegeben, abermals gemischt und nach weiteren 10 min mit Medium auf ein Gesamttransfektionsvolumen von 2 ml aufgefüllt. Von der erhaltenen Transfektionszusammensetzung wurden 1 ml pro Well auf die Zellen aufgegeben. Die in Fig. 10 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die höchste Steigerung bei einem Gehalt von 7.5 Mol% DPPE-INF7dimer erhalten wurde.

## Tabelle

Sequenzen und Ursprung der membranaktiven Peptide

Peptid	Ursprung	Sequenz
Melittin	Bienengift	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ
INF6	Influenzavirus	GLF GAI AGFI ENGW EGMI DGWYG
INF5	Influenzavirus, saure Mutante	[GLF EAI EGFI ENGW EGnIDG] <sub>2</sub> K
INF10	Influenzavirus, EGLA-Hybrid	GLF ELA EGLA ELGW EGLA EGWYGC
INFA	Influenzavirus, saure Alaninmutante	GLF EAI EAFI ENAW EAMI DAWYG
EGLA-I	künstlich	GLFL GLA EGLA EGLA EGLA EGLA EGL EGLA GGSC
INF7dimer	Influenzavirus, saure Mutante	[GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGWYG] <sub>2</sub> KC
INF8	Influenzavirus, saure Phenylalaninmutante	[GLF EAI EGFI ENGf EGMI DGGG] <sub>2</sub> K
INF9	künstlich	GLF ELA EGLA ELGA EGLA EGWYGC
EGLA-II	künstlich	WEA GLA EGLA EGLA EGLA EGLA EGL EGLA GGSC
EGLA-III	künstlich	GLF EGA EGLA EGA EGLA EGLA EGWY GAC
EGLA-IV	künstlich	GLF EGA EGLA EGW EGLA EGLA EGWY GAC

n: Norleucin

## Literatur

- Allen, T. M., Hong, K., und Papahadjopoulos, D.  
(1990) *Biochem.* 29, 2976-2985.
- Barthel, F., Remy, J-S., Loeffler, J-P., und Behr, J-P. (1993) *DNA und Cell Biol.* 12, 553-560.
- Behr, J-P., Demeneix, B., Loeffler, J-P., und Perez-Mutul, J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6982-6986.
- Behr, J-P. (1993) *Acc. Chem. Res.* 26, 274-278.
- Behr, J-P. (1994) *Bioconjugate Chem.* 5, 382-389.
- Berkner, K.L. (1988) *BioTechniques* 6, 616-629
- Bowman, E. J., Siebers, A., und Altendorf, K.  
(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7972-7976.
- Curiel, D. T., Agarwal, S., Wagner, E. und Cotten, M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8850-8854.
- Farhood, H., Serbina, N., und Huang, L. (1995)  
*Biochim. Biophys. Acta* 1235, 289-295.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., und Danielsen, M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7413-7417.
- Felgner, P. L., und Ringold, G. M. (1989) *Nature* 337, 387-388.
- Felgner, J. H., Kumar, R., Sridhar, C. N., Wheeler, C. J., Tsai, Y. J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M., und Felgner, P. L. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 2550-2561.
- Gao, X, und Huang, L. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 280-285.
- Hawley-Nelson, P., Ciccarone, V., Gebeyehu, G., und Jessee, J. (1993) *Focus* 15, 73-79.
- Hirons, G. T., Fawcett, J. J., und Crissman, H. A. (1994) *Cytometry* 15, 129-140.

- Kamata, H., Yagisawa, H., Takahashi, S., und  
Hirata, H. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 536-537.
- Knorr, R., Trzeciak, A., Bannwarth, W., und Gillessen,  
D. (1989) *Tetrahedron Lett.* 30, 1927-1930.
- Le Bole'h, G., Le Bris, N., Yaouanc, J. J., Clément,  
J. C., und Abbayes, H. (1995) *Tetrahedron  
Letters* 36, 37, 6681-6684
- Leventis, R., und Silvius, J. R. (1990) *Biochim.  
Biophys. Acta* 1023, 124-132.
- Litzinger, D. C., und Huang, L. (1992) *Biochim.  
Biophys. Acta* 1113, 201-227.
- Martin, F.J., Heath, T.D. und New, R.R.C. (1989)  
*Liposomes a practical approach*, (R:R:C: New, Ed.),  
Chapter 4, pp. 163-12, IRL Press, Oxford  
University Press, Oxford, England.
- Miller, A.D. (1992) *Nature (London)* 357, 455-460
- Mulligan, R.C. (1993) *Science* 260, 926-931
- Parente, R. A., Nir, S., und Szoka, F. C. (1988)  
*J. Biol. Chem.* 263, 4724-473.
- Parente, R. A., Nir, S., und Szoka, F. C. (1988)  
*Biochem.* 29, 8720-8727.
- Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M., Mechtler, K., und  
Wagner, E. (1992) *Bioconjugate Chem.* 3, 533-539.
- Plank, C., Oberhauser, B., Mechtler, K., Koch, C.,  
und Wagner, E. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 12918-  
12924.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 1980, Mack Publ.  
Co., Easton, PA, Osol (ed.).
- Remy, J-S., Sirlin, C., Vierling, P., und Behr, J-P.  
(1994) *Bioconjugate Chem.* 5, 647-654.
- Remy, J-S., Kichler, A., Mordvinov, V., Schuber, F.,  
und Behr, J-P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*  
92, 1744-1748.
- Rose, J. K., Buonocore, L., und Whitt, M. A. (1991)  
*BioTechniques* 10, 520-525.

- Ruysschaert, J. M., Ouahabi, A. E., Willeaume, V.,  
Huez, G., Fuks, R., Vandenbranden, M., und  
Di Stefano, P., (1994) *Biochemical and Biophysical  
Research Communications* 203, 3, 1622-1628.
- Rye, H. S., Yue, S., Wemmer, D. E., Quesada, M. A.,  
Haugland, R. P., Mathies, R. A., und Glazer, A.  
N. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20, 2803-2812.
- Siegel, D. P., Banschbach, J., Alford, D., Ellens,  
H., Lis, L. J., Quinn, P. J., Yeagle, P. L., und  
Bentz, J. (1989) *Biochem.* 28, 3703-3709.
- Solodin, I., Brown, C. S., Bruno, M. S., Chow, C. Y.,  
Jang, E. H., Debs, R. J., und Heath, T. D. (1995)  
*Biochem.* 34, 13537-13544.
- Wagner, E., Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M.,  
und Birnstiel, M. L. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.  
USA* 89, 7934-7938.
- Wagner, E., Curiel, D. T., und Cotten, M. (1994) *Adv.  
Drug Del. Rev.* 14, 113-135.
- Weibel, J-M., Kichler, A., Remy, J-S., Gaiddon, C.,  
Loeffler, J-P., Duportail, G., und Heissler, D.  
(1995) *Chem. Lett.* June, 473-474.
- Wrobel, I., und Collins, D. (1995) *Biochim. Biophys.  
Acta* 1235, 296-304.
- Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai,  
M., und Tashiro, Y. (1991) *J. Biol. Chem.* 266,  
17707-17712.
- Zabner, J., Fasbender, A. J., Moninger, T.,  
Poellinger, K. A., und Welsh, M. J. (1995) *J. Biol.  
Chem.* 270, 18997-19007.
- Zauner, W., Blaas, D., Kuechler, E., und Wagner, E.,  
(1995) *J. Virol.* 69, 1085-1092.
- Zauner, W., Kichler, A., Schmidt, W., Sinski, A.,  
und Wagner, E. (1996) *BioTechniques*, in press.
- Zhou, X., und Huang, L. (1994) *Biochim. Biophys. Acta*  
1189, 195-203.

## Patentansprüche

1. Zusammensetzung für die Transfektion von höheren eukaryotischen Zellen, wobei die Zusammensetzung einen Komplex, enthaltend eine in der Zelle zu exprimierende Nukleinsäure sowie, in einer für die Transfektion suboptimalen Konzentration, ein oder mehrere kationische Lipide, sowie gegebenenfalls Helferlipid(e) enthält, dadurch gekennzeichnet, daß die Zusammensetzung ein oder mehrere membranaktive saure Peptide enthält, wobei das Verhältnis der Gesamtzahl der positiven zur Gesamtzahl der negativen Ladungen in der Zusammensetzung ca. 0 bis ca. 3 beträgt.
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Verhältnis der positiven zu den negativen Ladungen der Zusammensetzung ca. 0 bis ca. 2 beträgt.
3. Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die suboptimale Konzentration von kationischem Lipid, gegebenenfalls in Mischung mit Helferlipid, einer Konzentration entspricht, bei der die Transfektionseffizienz um einen Faktor von mindestens ca. 2 geringer ist als bei optimaler Konzentration.
4. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Peptid der Bezeichnung INF6 mit der Sequenz GLF GAI AGFI ENGW EGMI DGWYG enthält.

5. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Peptid der Bezeichnung INF10 mit der Sequenz GLF ELA EGLA ELGW EGLA EGWYGC enthält.
6. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Peptid der Bezeichnung INF5 mit der Sequenz [GLF EAI EGFI ENGW EGnIDG]<sub>2</sub> K enthält.
7. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie Peptid der Bezeichnung EGLA-I mit der Sequenz GLFL GLA EGLA EGLA EGLA EGLA EGL EGL EGLA GGSC enthält.
8. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Peptid der Bezeichnung INFA mit der Sequenz GLF EAI EAFI ENAW EAMI DAWYG enthält.
9. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Peptid der Bezeichnung INF8 mit der Sequenz [GLF EAI EGFI ENGFI EGMI DGGG]<sub>2</sub> K enthält.
10. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Peptid der Bezeichnung INF9 mit der Sequenz GLF ELA EGLA ELGA EGLA EGWYGC enthält.
11. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Peptid der Bezeichnung EGLA-II mit der Sequenz WEA GLA EGLA EGLA EGLA EGLA EGL EGL EGLA GGSC enthält.



12. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Peptid der Bezeichnung EGLA-III mit der Sequenz GLF EGA EGLA EGA EGLA EGLA EGWY GAC enthält.
13. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Peptid der Bezeichnung EGLA-IV mit der Sequenz GLF EGA EGLA EGW EGLA EGLA EGWY GAC enthält.
14. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Peptid der Bezeichnung INF7dimer mit der Sequenz [GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGWYG]<sub>2</sub> KC enthält.
15. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das membranaktive Peptid mit einem Lipid modifiziert ist.
16. Zusammensetzung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid mit Dipalmitoylphosphatidylethanolamyl (DPPE) modifiziert ist.
17. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das kationische Lipid ein Lipopolyamin ist.
18. Zusammensetzung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Lipopolyamin Dioctadecylamidoglycylspermin (DOGS) ist.
19. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein oder mehrere Helferlipide, ausgewählt aus der

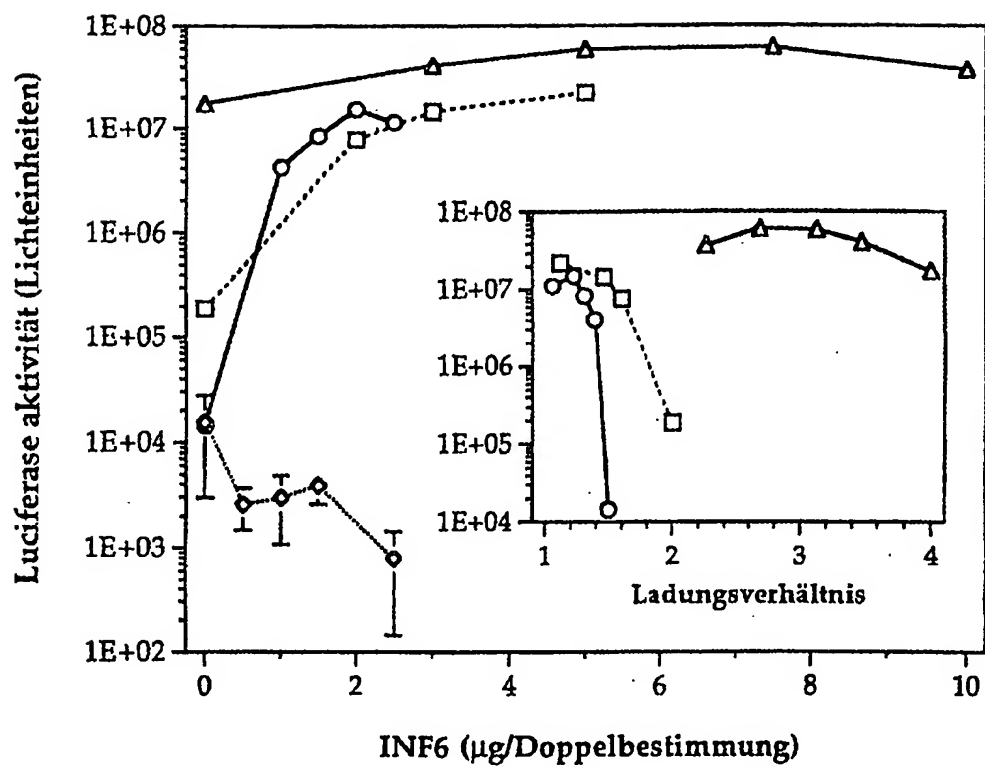
Gruppe Phosphatidylethanolamine,  
Phosphatidylglycerine und Diacylglycerine,  
enthält.

20. Zusammensetzung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Helferlipid Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) enthält.
21. Zusammensetzung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Helferlipid Oleoyl-palmitoylphosphatidylethanolamin (POPE) enthält
22. Zusammensetzung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Helferlipid 1-Mono-oleoyl-rac-glycerin (MOG) enthält
23. Zusammensetzung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Helferlipid 1.2-di-Oleoyl-rac-glycerin (DOG) enthält.
24. Zusammensetzung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Helferlipid Eiphsphatidylcholin (EPC) enthält.
25. Zusammensetzung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Helferlipid Eiphsphatidylethanolamin (EPE) enthält.
26. Zusammensetzung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Helferlipid Cholesterin enthält.
27. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend als wirksame Komponente eine Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 25.

28. Verfahren zur Transfektion höherer eukaryotischer Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß man die Zellen mit einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 26 in Berührung bringt.
29. Anwendung des Verfahrens nach Anspruch 28 auf Säugetierzellen *in vitro* oder *ex vivo*.

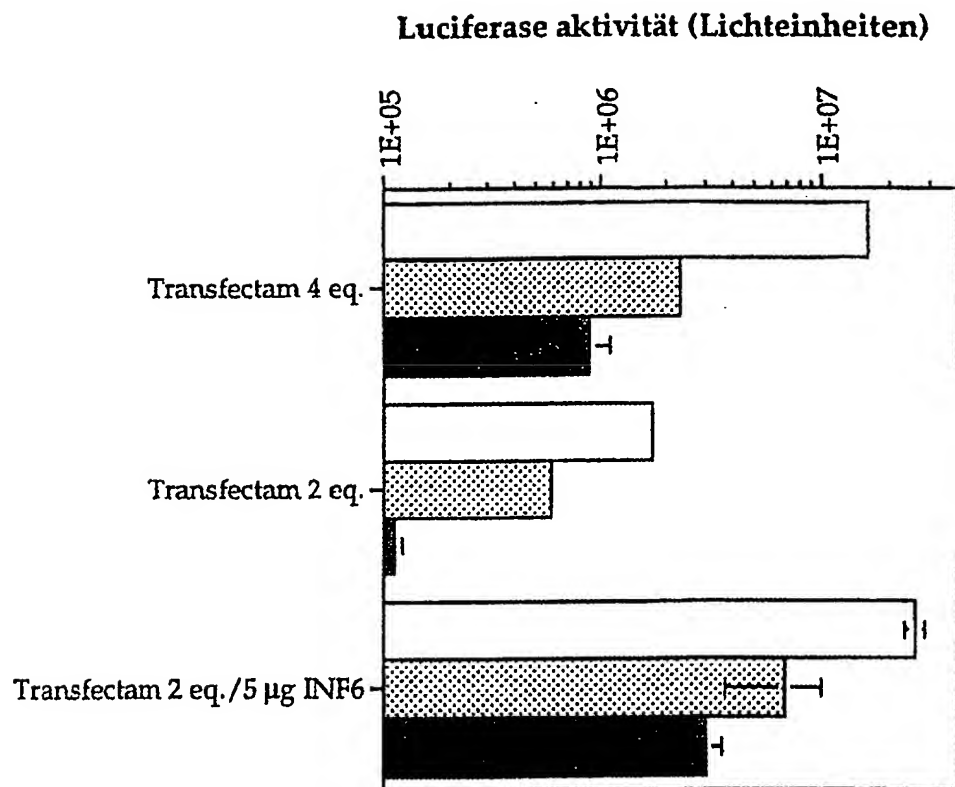
1/11

Fig. 1

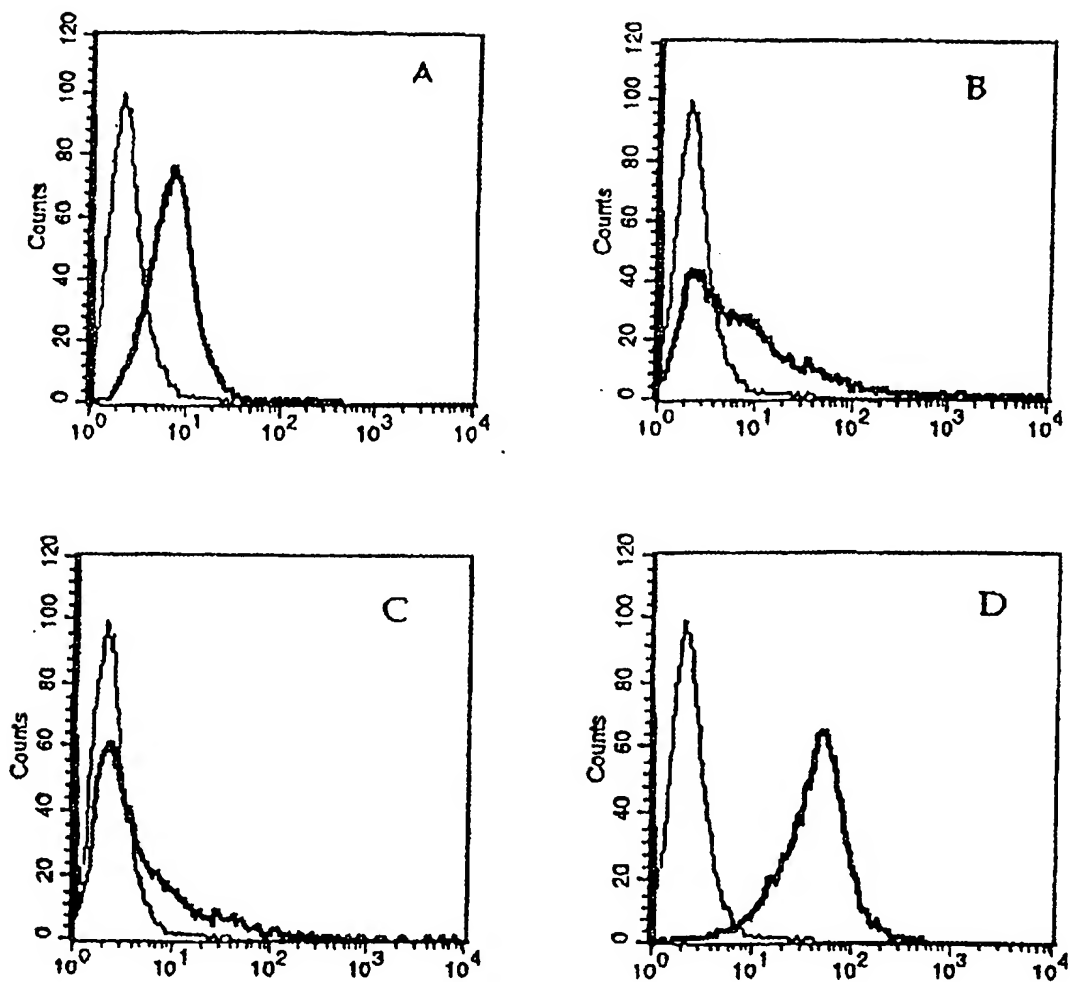


2/11

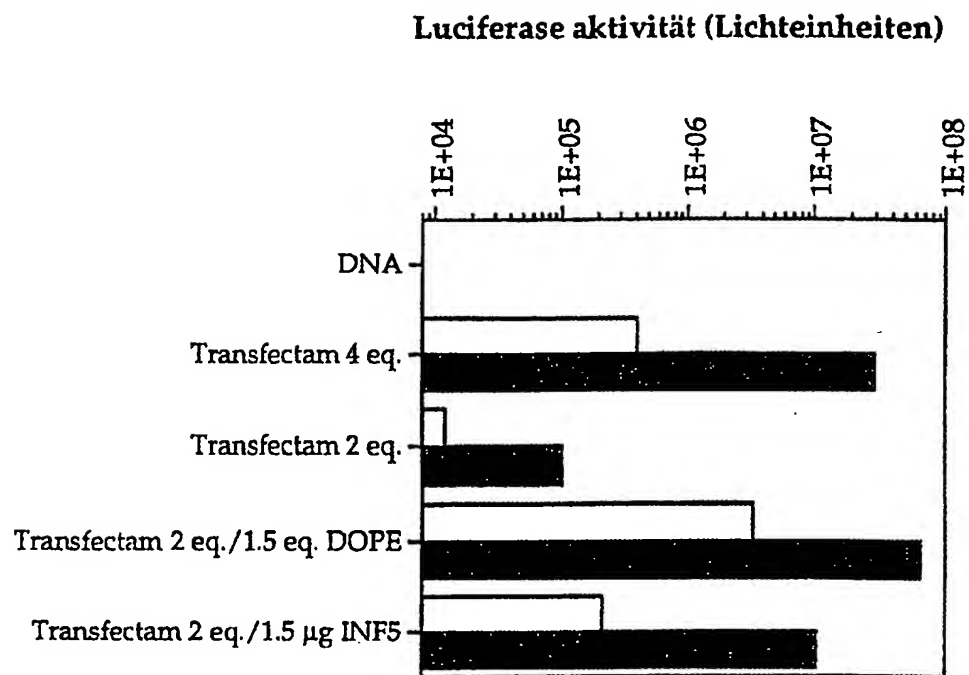
Fig. 2



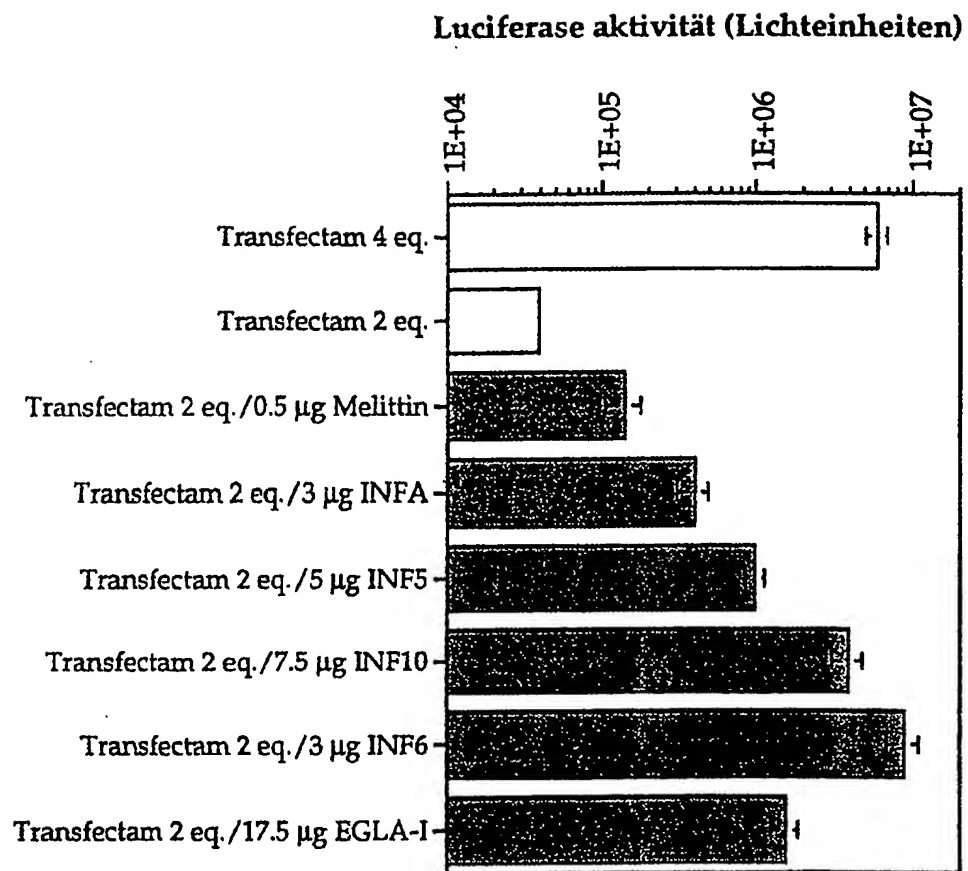
3/11  
Fig. 3A



4/11  
Fig. 3B

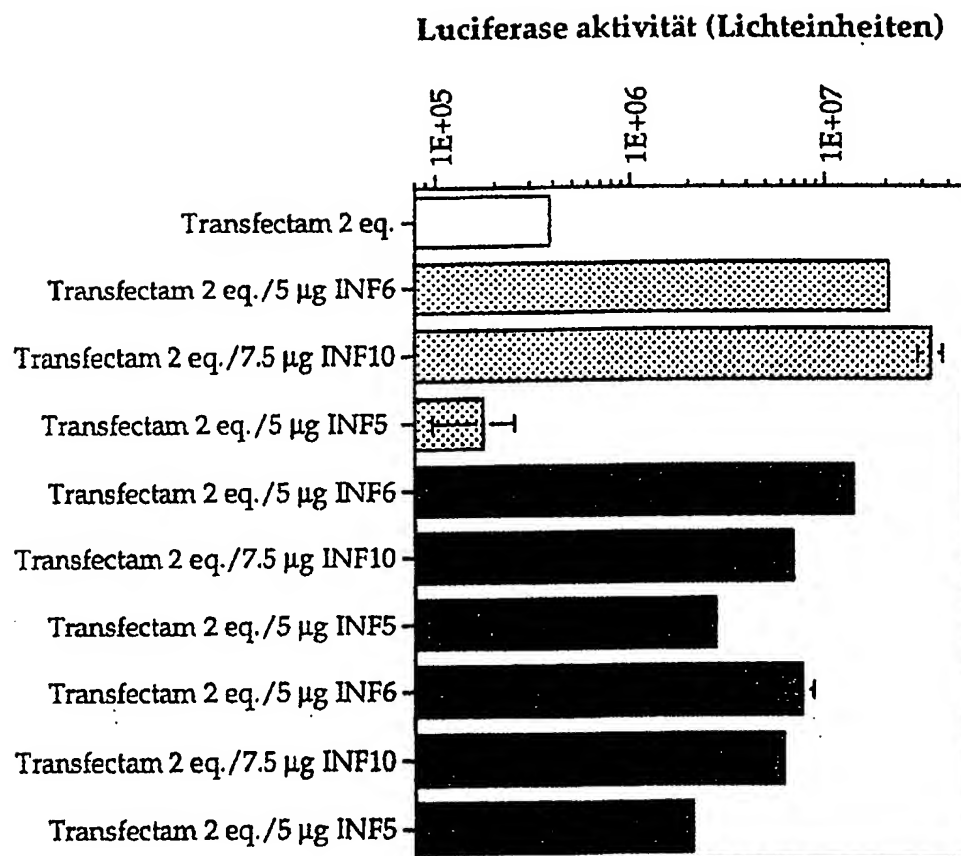


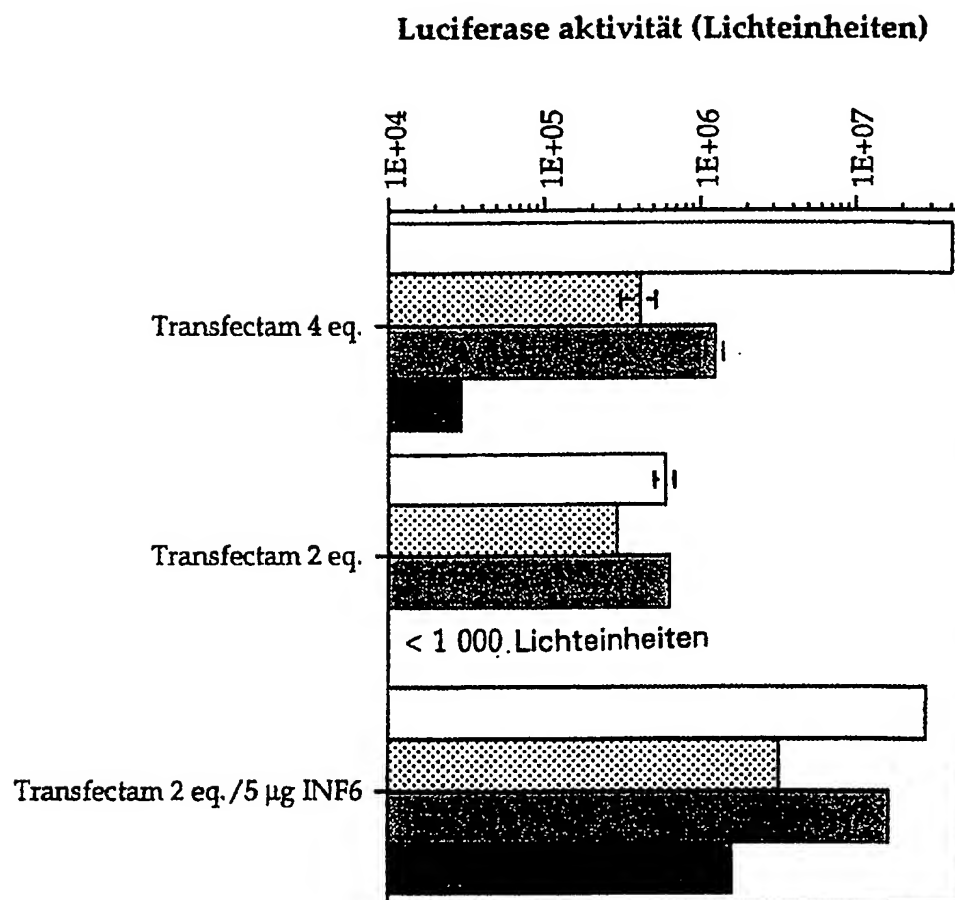
5/11  
Fig. 4





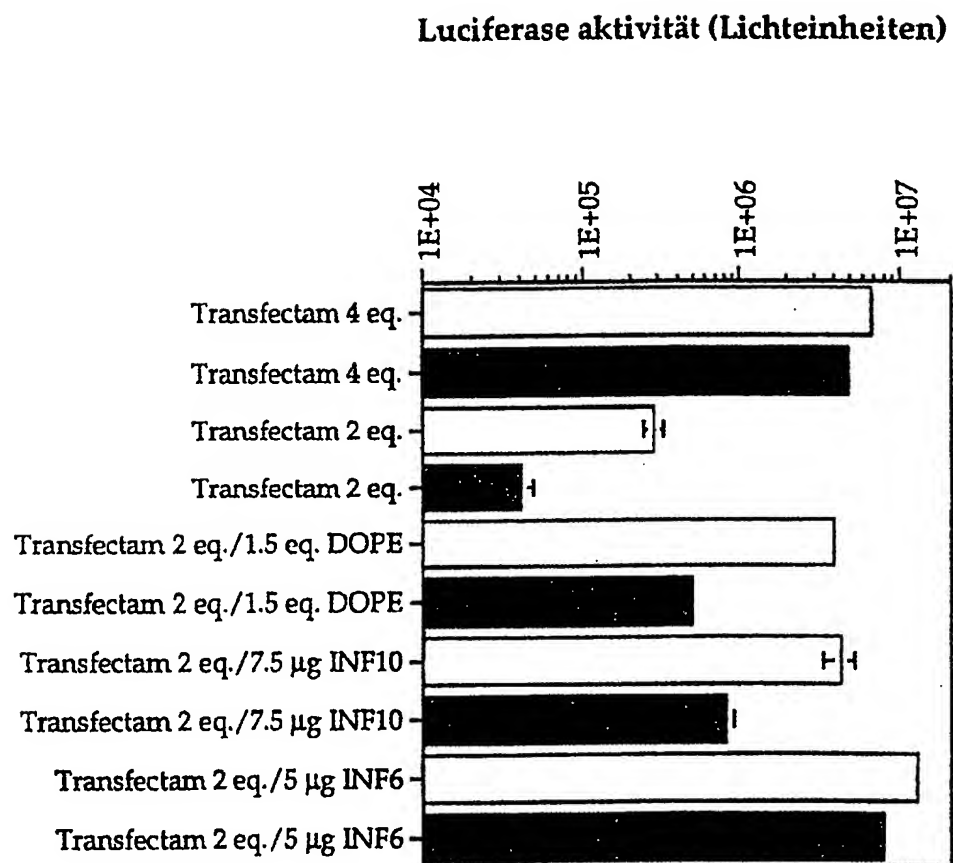
6/11  
Fig. 5



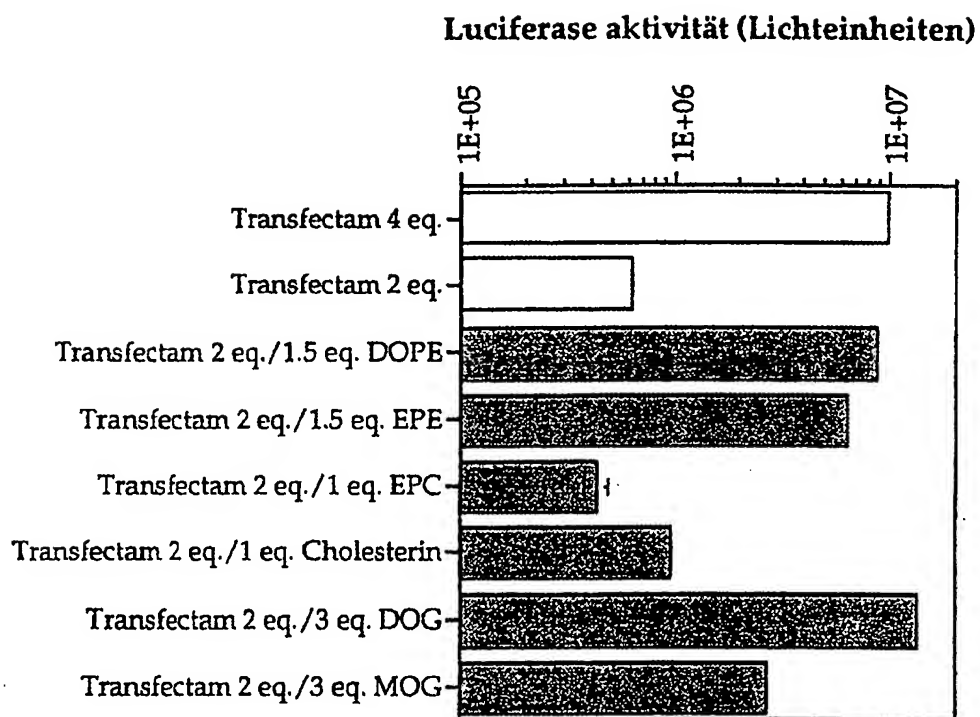
7/11  
Fig. 6

8/11

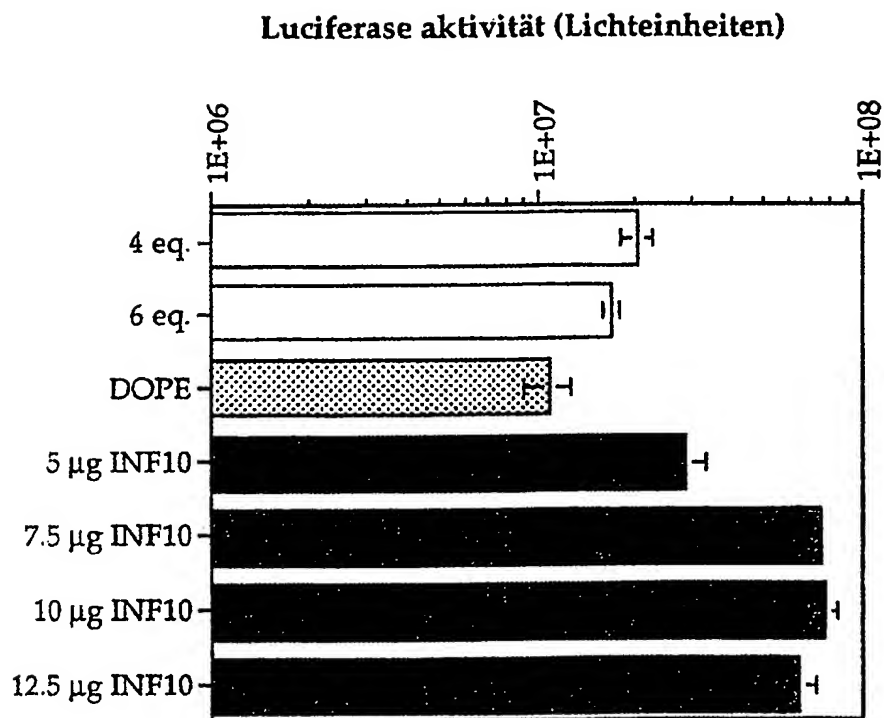
Fig. 7



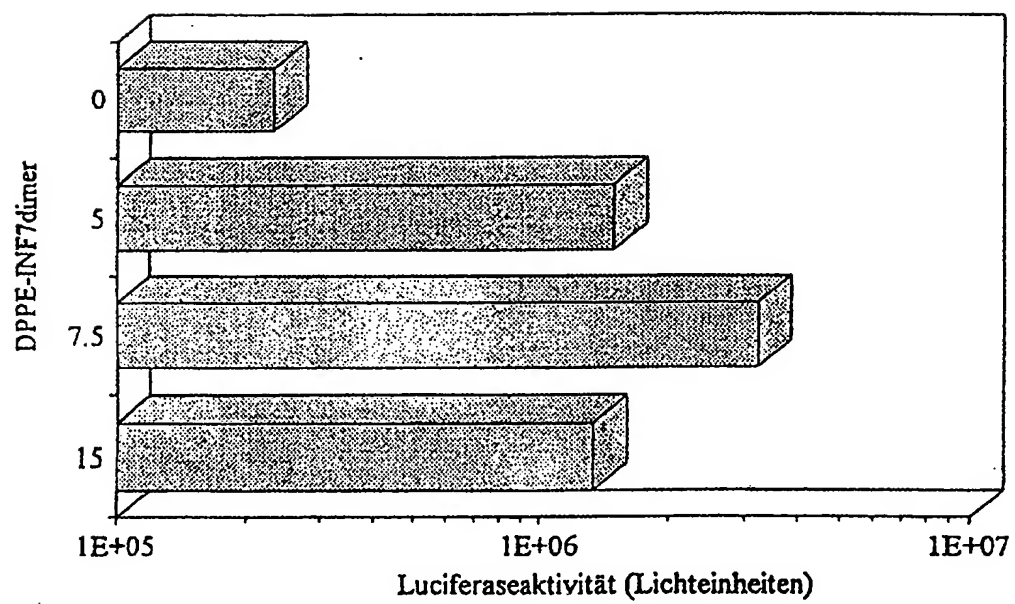
9/11  
Fig. 8



10/11  
Fig. 9



11/11  
Fig. 10



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 97/00649

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/88 A61K31/70 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 22, no. 3, 11 February 1994, IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND, pages 536-537, XP002034234 H. KAMATA ET AL.: "Amphiphilic peptides enhance the efficiency of liposome-mediated DNA transfection" cited in the application	1,2
Y	see the whole document --- -/--	4,6

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 July 1997

Date of mailing of the international search report

18.07.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/00649

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 17, 29 April 1994, pages 12918-12924, XP000615488 PLANK C ET AL: "THE INFLUENCE OF ENDOSOME-DISRUPTIVE PEPTIDES ON GENE TRANSFER USING SYNTHETIC VIRUS-LIKE GENE TRANSFER SYSTEMS" cited in the application see the whole document ---	4,6
A	J. VIROLOGY, vol. 69, no. 2, February 1995, AM.SOC.MICROBIOL.,WASHINGTON,US, pages 1085-1092, XP002034235 W. ZAUNER ET AL.: "Rhinovirus-mediated endosomal release of transfection complexes" see the whole document ---	1-29
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 89, no. 17, 1 September 1992, pages 7934-7938, XP000371760 WAGNER E ET AL: "INFLUENZA VIRUS HEMAGGLUTININ HA-2 N-TERMINAL FUSOGENIC PEPTIDES AUGMENT GENE TRANSFER BY TRANSFERRIN-POLYLYSINE-DNA COMPLEXES: TOWARD A SYNTHETIC VIRUS-LIKE GENE-TRANSFER VEHICLE" cited in the application see the whole document ---	1-29
A	WO 93 07283 A (BOEHRINGER INGELHEIM INT ;UNIV NORTH CAROLINA (US); GENENTECH INC) 15 April 1993 cited in the application see the whole document ---	1-29
A	WO 95 21259 A (US GOVERNMENT ;LIFE TECHNOLOGIES INC (US)) 10 August 1995 see the whole document ---	1-29
A	BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 5, no. 5, 1 September 1994, pages 382-389, XP000465949 BHER J -P: "GENE TRANSFER WITH SYNTHETIC CATIONIC AMPHIPHILES: PROSPECTS FOR GENE THERAPY" cited in the application see the whole document ---	1-29

-/--



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/00649

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 18863 A (RHONE POULENC RORER SA ;BEHR JEAN PAUL (FR); DEMENEIX BARBARA (FR)) 13 July 1995 cited in the application see the whole document ---	1-29
A	WO 95 02698 A (LIFE TECHNOLOGIES INC) 26 January 1995 cited in the application see the whole document ---	1-29
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 92, no. 5, February 1995, pages 1744-1748, XP000601443 REMY J -S ET AL: "TARGETED GENE TRANSFER INTO HEPATOMA CELLS WITH LIPOPOLYAMINE-CONDENSED DNA PARTICLES PRESENTING GALACTOSE LIGANDS: A STAGE TOWARD ARTIFICIAL VIRUSES" cited in the application see the whole document ---	1-29
P,X	WO 96 40961 A (LIFE TECHNOLOGIES INC ;HAWLEY NELSON PAMELA (US); LAN JIANQING (US)) 19 December 1996 see page 2, line 5 - page 7, line 16 see page 17, line 11 - line 21 see claims 1-55; example 5 ---	1,2
E	WO 97 10851 A (OPPERBAS HOLDING BV ;BARU MOSHE (IL); NUR ISRAEL (IL)) 27 March 1997 see page 4, line 5 - line 10 see page 8, line 30 - page 15, line 23; claims 1-8; table V ---	1,2
T	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 126, no. 17, 28 April 1997 Columbus, Ohio, US; abstract no. 221189r, MECHTLER, KARL ET AL: "Gene transfer mediated by influenza virus peptides: the role of peptide sequences" page 127; column 1; XP002034236 see abstract P,X & NEW J. CHEM. ( 1997 ), 21(1), 105-111 CODEN: NJCHE5;ISSN: 1144-0546, January 1997, ---	1-8, 19-29
P,X	---	1-8, 19-29

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/00649

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 8, no. 2, March 1997 - April 1997, AMERICAN CHEM. SOC.,US, pages 213-221, XP000682496 A. KICHLER ET AL.: "Influence of membrane-active peptides on lipospermine/DNA complex mediated gene transfer" see the whole document -----</p>	<p>1-8, 19-29</p>

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/00649

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9307283 A	15-04-93	AU 671084 B	15-08-96
		AU 2652692 A	03-05-93
		BG 98718 A	28-02-95
		BR 9206559 A	08-11-94
		CA 2118816 A	31-03-93
		CZ 9400746 A	17-05-95
		EP 0545016 A	09-06-93
		EP 0607206 A	27-07-94
		FI 941474 A	30-03-94
		HU 71312 A	28-11-95
		HU 9500694 A	29-01-96
		NO 941154 A	29-03-94
		NZ 244306 A	26-07-95
		SK 36894 A	10-08-94
		US 5547932 A	20-08-96
		ZA 9207460 A	21-02-94
		CN 1070946 A	14-04-93
WO 9521259 A	10-08-95	AU 1688695 A	21-08-95
WO 9518863 A	13-07-95	FR 2714830 A	13-07-95
		AU 1458395 A	01-08-95
		CA 2180872 A	13-07-95
		EP 0738328 A	23-10-96
		FI 962799 A	09-07-96
		NO 962791 A	02-07-96
		ZA 9500137 A	09-09-95
WO 9502698 A	26-01-95	US 5578475 A	26-11-96
WO 9640961 A	19-12-96	AU 5979296 A	30-12-96
WO 9710851 A	27-03-97	AU 6888496 A	09-04-97

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 97/00649

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12N15/88 A61K31/70 A61K47/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 22, Nr. 3, 11. Februar 1994, IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND, Seiten 536-537, XP002034234 H. KAMATA ET AL.: "Amphiphilic peptides enhance the efficiency of liposome-mediated DNA transfection" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,2
Y		4,6
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen and der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. Juli 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18.07.97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patendaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 269, Nr. 17, 29.April 1994, Seiten 12918-12924, XP000615488 PLANK C ET AL: "THE INFLUENCE OF ENDOSOME-DISRUPTIVE PEPTIDES ON GENE TRANSFER USING SYNTHETIC VIRUS-LIKE GENE TRANSFER SYSTEMS" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	4,6
A	J. VIROLOGY, Bd. 69, Nr. 2, Februar 1995, AM.SOC.MICROBIOL.,WASHINGTON,US, Seiten 1085-1092, XP002034235 W. ZAUNER ET AL.: "Rhinovirus-mediated endosomal release of transfection complexes" siehe das ganze Dokument ---	1-29
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 89, Nr. 17, 1.September 1992, Seiten 7934-7938, XP000371760 WAGNER E ET AL: "INFLUENZA VIRUS HEMAGGLUTININ HA-2 N-TERMINAL FUSOGENIC PEPTIDES AUGMENT GENE TRANSFER BY TRANSFERRIN-POLYLYSINE-DNA COMPLEXES: TOWARD A SYNTHETIC VIRUS-LIKE GENE-TRANSFER VEHICLE" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-29
A	WO 93 07283 A (BOEHRINGER INGELHEIM INT ;UNIV NORTH CAROLINA (US); GENENTECH INC) 15.April 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-29
A	WO 95 21259 A (US GOVERNMENT ;LIFE TECHNOLOGIES INC (US)) 10.August 1995 siehe das ganze Dokument ---	1-29
A	BIOCONJUGATE CHEMISTRY, Bd. 5, Nr. 5, 1.September 1994, Seiten 382-389, XP000465949 BHER J -P: "GENE TRANSFER WITH SYNTHETIC CATIONIC AMPHIPHILES: PROSPECTS FOR GENE THERAPY" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-29
	---	

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 95 18863 A (RHONE POULENC RORER SA ;BEHR JEAN PAUL (FR); DEMENEIX BARBARA (FR)) 13.Juli 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-29
A	WO 95 02698 A (LIFE TECHNOLOGIES INC) 26.Januar 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-29
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 92, Nr. 5, Februar 1995, Seiten 1744-1748, XP000601443 REMY J -S ET AL: "TARGETED GENE TRANSFER INTO HEPATOMA CELLS WITH LIPOPOLYAMINE-CONDENSED DNA PARTICLES PRESENTING GALACTOSE LIGANDS: A STAGE TOWARD ARTIFICIAL VIRUSES" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-29
P,X	WO 96 40961 A (LIFE TECHNOLOGIES INC ;HAWLEY NELSON PAMELA (US); LAN JIANQING (US)) 19.Dezember 1996 siehe Seite 2, Zeile 5 - Seite 7, Zeile 16 siehe Seite 17, Zeile 11 - Zeile 21 siehe Ansprüche 1-55; Beispiel 5 ---	1,2
E	WO 97 10851 A (OPPERBAS HOLDING BV ;BARU MOSHE (IL); NUR ISRAEL (IL)) 27.März 1997 siehe Seite 4, Zeile 5 - Zeile 10 siehe Seite 8, Zeile 30 - Seite 15, Zeile 23; Ansprüche 1-8; Tabelle V ---	1,2
T	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 126, no. 17, 28.April 1997 Columbus, Ohio, US; abstract no. 221189r, MECHTLER, KARL ET AL: "Gene transfer mediated by influenza virus peptides: the role of peptide sequences" Seite 127; Spalte 1; XP002034236 siehe Zusammenfassung & NEW J. CHEM. ( 1997 ), 21(1), 105-111 CODEN: NJCHE5;ISSN: 1144-0546, Januar 1997, ---	1-8, 19-29
P,X	---	1-8, 19-29

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 97/00649

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	<p>BIOCONJUGATE CHEMISTRY, Bd. 8, Nr. 2, März 1997 - April 1997, AMERICAN CHEM. SOC.,US. Seiten 213-221, XP000682496 A. KICHLER ET AL.: "Influence of membrane-active peptides on lipospermine/DNA complex mediated gene transfer" siehe das ganze Dokument -----</p>	<p>1-8, 19-29</p>

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/00649

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9307283 A	15-04-93	AU 671084 B	15-08-96
		AU 2652692 A	03-05-93
		BG 98718 A	28-02-95
		BR 9206559 A	08-11-94
		CA 2118816 A	31-03-93
		CZ 9400746 A	17-05-95
		EP 0545016 A	09-06-93
		EP 0607206 A	27-07-94
		FI 941474 A	30-03-94
		HU 71312 A	28-11-95
		HU 9500694 A	29-01-96
		NO 941154 A	29-03-94
		NZ 244306 A	26-07-95
		SK 36894 A	10-08-94
		US 5547932 A	20-08-96
		ZA 9207460 A	21-02-94
		CN 1070946 A	14-04-93
-----			
WO 9521259 A	10-08-95	AU 1688695 A	21-08-95
-----			
WO 9518863 A	13-07-95	FR 2714830 A	13-07-95
		AU 1458395 A	01-08-95
		CA 2180872 A	13-07-95
		EP 0738328 A	23-10-96
		FI 962799 A	09-07-96
		NO 962791 A	02-07-96
		ZA 9500137 A	09-09-95
-----			
WO 9502698 A	26-01-95	US 5578475 A	26-11-96
-----			
WO 9640961 A	19-12-96	AU 5979296 A	30-12-96
-----			
WO 9710851 A	27-03-97	AU 6888496 A	09-04-97
-----			



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**